Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
(theoretische und experimentelle Radiologie)
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS EINER PARTIELLEN SYNCHRONISATION AUF ZYTOSTATISCHE UND ZYTOTOXISCHE EFFEKTE VON CYCLOPHOSPHAMID NACH STOSSTHERAPIE BEI DER TUMORTRAGENDEN RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DIETER BERND MEEREIS

aus Berlin

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
(theoretische und experimentelle Radiologie)
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

ORIENTIERENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS EINER PARTIELLEN SYNCHRONISATION AUF ZYTOSTATISCHE UND ZYTOTOXISCHE EFFEKTE VON CYCLOPHOSPHAMID NACH STOSSTHERAPIE BEI DER TUMORTRAGENDEN RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DIETER BERND MEEREIS

aus Berlin

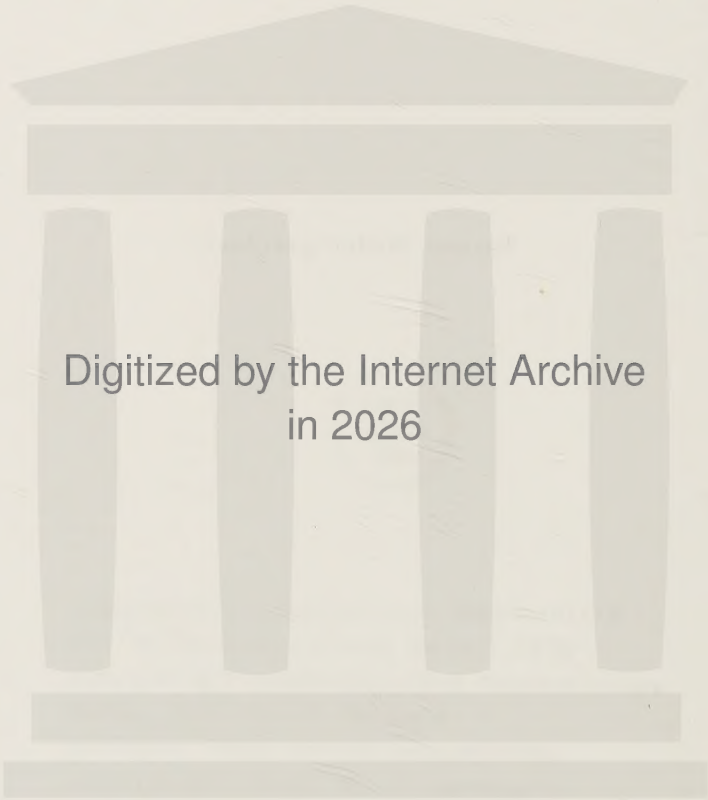
Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 14.7.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. E. Schaumlöffel
Correferent: Prof. Dr. H. Bernhardt

Meinem Bruder gewidmet


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0056

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UNG METHODIK	5
2.1.	Charakterisierung von ^{3}H-Cyclophosphamid und Chemikalien	5
2.2.	Tierexperimente	6
2.3.	Probenaufbereitung zur Radioaktivitätsbestimmung	8
2.4.	Bestimmung der DNS- und RNS-Gehalte und der spezifischen Alkylierungen der Nukleinsäuren	9
2.5.	Radiochromatographie	11
2.6.	Radioaktivitätsbestimmung	12
2.7.	Auswertung der Ergebnisse	12
3.	ERGEBNISSE	14
3.1.	Charakterisierung chromatographisch analysierter Substanzen	14
3.2.	Renale Ausscheidungen an Cyclophosphamid und Metaboliten nach i.v. Stoßtherapie mit und ohne i.p. Vincristin-Vorbehandlung	17
3.3.	Spezifische Organkonzentrationen an Cyclophosphamid und Metaboliten 120 h nach i.v. Stoßtherapie mit und ohne Vincristin-Vorbehandlung	22
3.4.	Spezifische Konzentrationen und spezifische Alkylierungen von Nukleinsäuren verschiedener Organe nach i.v. Stoßtherapie von Cyclophosphamid mit und ohne Vincristin-Vorbehandlung	30
3.5.	Desoxy-Thymidin-Indices in Organen der Ratte nach i.v. Cyclophosphamid-Stoßtherapie mit und ohne Vincristin-Vorbehandlung	36

Seite

4. DISKUSSION 38

5. ZUSAMMENFASSUNG 49

6. LITERATURVERZEICHNIS 52

ANHANG

1. EINLEITUNG

Die Chemotherapie hat neben den sogenannten klassischen Methoden der Behandlung der menschlichen Tumoren, der Chirurgie und Strahlentherapie, einen festen Platz gefunden. Dabei steht außer Zweifel, daß die Chemotherapie auf diesem Gebiet längst noch nicht die Erfolge aufzuweisen hat, wie seit der Einführung durch Paul Ehrlich im Bereich der bakteriellen Infektionen. Infektionen durch Mikroorganismen sprechen auf Grund der von menschlichen und tierischen Zellen stark differierenden Stoffwechselfunktionen relativ gut auf Chemotherapie an. Eine wirksame Chemotherapie maligner Zellen wird durch den geringen Grad der Fremdheit gegenüber normalen Körperzellen und durch die Allgemeintoxizität dieser Substanzen stark limitiert. So müssen wir auch heute noch menschliche Tumoren, sowohl auf Grund ihrer Differenzierung, als auch auf Grund der unterschiedlichen Durchblutungsgrößen in Verbindung mit der Toxizität der Zytostatika, die sich unter anderem auf blutbildende Organe, ZNS, Niere, Blase etc., auswirkt, in gut, kaum oder überhaupt nicht chemotherapeutisch beeinflußbare Tumorgewebe, im Sinne einer Heilung klassifizieren (12). Schon allein durch diese Spezifität der verschiedenen Tumorarten sind somit der Chemotherapie Grenzen gesetzt. Wenn die Chemotherapie trotzdem Erfolge aufweist, durch die sie letzten Endes die heutige Rangstellung erlangte, so ist dies nicht zuletzt das Ergebnis der intensiven Forschung mit und über diese zytostatisch wirksamen Substanzen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Verbindungen mit antitumoraler Wirkung. Ein seit Anfang der 60er Jahre im

Handel befindliches Zytostatikum,das Cyclophosphamid[1], gilt heute noch als Standardpräparat in der Krebs - Chemotherapie. Allein die Zahl von 3000 wissenschaftlichen Arbeiten über diese Substanz in den letzten 15 Jahren dürfte dies bestätigen (vergl. 20). Cyclophosphamid wird auf Grund einer NH - Lost - Gruppe im Molekül den alkylierenden Zytostatika zugeordnet. Es ist eine in vitro inaktive chemische Verbindung, die erst im Organismus in die aktive Form umgewandelt wird (Transportform / Wirkform-Prinzip). Durch mischfunktionelle Oxidation vorwiegend mikrosomaler Enzymsysteme der Leber entsteht als primäres Aktivierungsprodukt das 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit seinem ringoffenen Tautomeren Aldophosphamid im Gleichgewicht steht, aus dem nach Abspaltung von Acrolein das starke Alkylanz NH - Lost - Phosphorsäure - diamid, die "Friedmannsäure", in der Zelle freigesetzt wird und die möglicherweise die eigentliche zytostatische Wirkform darstellt (1, 10, 21, 23, 45, 49). 1962 konnten BROCK und HOHORST zeigen (3, 4), daß die Aktivierung des Cyclophosphamid zu zytostatisch wirksamen Metaboliten hauptsächlich in der Leber, zum geringen Teil auch in der Lunge, stattfindet. Auch konnte ein sehr günstiger therapeutischer Index (DL50 / DC50) (3,4,5) und eine selektive Tumorwirkung des Cyclophosphamid (3, 4, 22) nachgewiesen werden.

Große Bedeutung in der Chemotherapie der Tumoren haben in jüngerer Zeit Überlegungen gefunden, eine möglicherweise unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Phasen des Zellzyklus für eine gezielte Therapie auszunutzen. So kam es zur Anwendung von Zytostatika als

[1] (Endoxan(R), Hersteller, Asta Werke AG, Bielefeld)

Synchronisationsmittel. Vincristin hat sich dabei besonders hervorgetan, da seine Wirkung, wie KLEIN (27, 28, 31, 32) und andere Autoren in umfangreichen Untersuchungen zeigen konnten, in der Mitose-Phase ansetzt (6, 7, 13, 36, 44, 47, 48), asynchrone Tumorzellpopulationen auftreten läßt, so daß in Abhängigkeit von der zeitlichen Dauer des Tumorzellzyklus, der Halbwertszeit für den Konzentrationsabfall im Serum sowie der Dosis an Vincristin, partiell synchronisierte Zellverbände entstehen (26, 39). Nach Aufheben des Mitoseblocks kommt es zu einer entsprechenden Vermehrung der Zellpopulation im Durchgang durch die einzelnen Zyklusphasen und damit auch durch die S-Phase. Durch Einsatz des spezifisch in der S- und G_2-Phase wirksamen Cyclophosphamid (11, 15, 27, 35, 36, 51) unter den Bedingungen dieser partiellen Synchronisation konnte dessen zytostatischer Effekt deutlich gesteigert werden (19, 24, 32, 37, 43). Diese kombinierte Therapie hat weitgehend in die Behandlung gewisser maligner Tumoren beim Menschen Eingang gefunden. Man wendet sie vorwiegend bei chirurgisch und radiologisch austherapierten oder nicht therapierbaren Patienten an.

Der vorliegenden Arbeit lag die Frage zu Grunde, ob mit radiochemischen und biochemischen Analysenverfahren Unterschiede der zytostatischen und zytotoxischen Effekte in Tumor und kritischen Organen bei der Stoßtherapie mit Cyclophosphamid an der tumortragenden Ratte mit und ohne partielle Teilsynchronisation durch Vorbehandlung mit unterschwelligen Dosen an Vincristin nachweisbar sind. Der Schwerpunkt lag in der Erfassung anzustrebender geringerer Zytotoxizität in kritischen Organen bei gesteigerter Tumorselektivität des Zytostatikums unter den Bedingungen der Kombinationstherapie. Bei Einsatz von hochspezifisch tritiiertem Cyclo-

phosphamid wurden die folgenden Untersuchungen am 5. Tag nach intravenöser Applikation des Zytostatikums mit und ohne Vincristin-Vorbehandlung durchgeführt.

1) Radiochromatographische Differenzierung der renalen Ausscheidungen an Cyclophosphamid und stabilen Abbauprodukten zur Erfassung veränderter Stoffwechselaktivitäten
2) Bestimmung der Restkonzentrationen in Tumor und kritischen Organen und die Größen an extrahierbaren freien Metaboliten des Cyclophosphamid
3) Ermittlung der spezifischen Konzentrationen an Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS) in Tumor und ausgewählten Organen
4) Bestimmung der spezifischen Alkylierungen (bzw. Fixierungen) der Nucleinsäuren
5. Erfassung der DNS-Syntheserate über den Desoxy-Thymidin-Index
6) Bestimmung der Tumorgewichte und Grades der Metastasierung

Über die angewandte Methodik und die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird im folgenden berichtet.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Charakterisierung von ^{3}H-Cyclophosphamid und Chemikalien

Das verwendete ^{3}H-Cyclophosphamid wurde in einer mehrstufigen Synthese durch Tritiierung der NH-Lost-Gruppe in der Abteilung für experimentelle Nuklearmedizin im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg hergestellt.
Die spezifische Aktivität betrug 0,7 mCi ^{3}H/mg Cyclophosphamid. Die radiochemische Reinheit lag bei ca 95 %

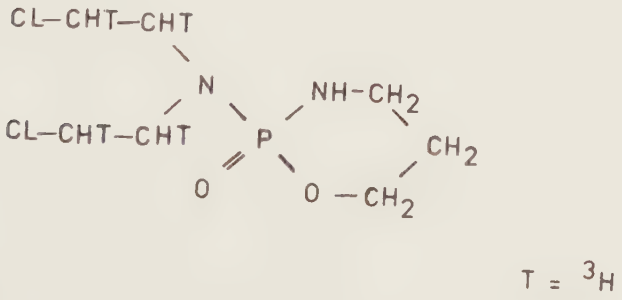


Abbildung 1: Strukturformel von ^{3}H-Cyclophosphamid

Alle benützten Chemikalien wurden mit p.a. Reinheitsgrad von der Firma Merck, Darmstadt, alle Szintillationschemikalien von der Firma W.Zinsser, Frankfurt, bezogen.

2.2. Tierexperimente

In den Untersuchungen wurden weibliche, tumortragende (solides Yoshida-Sarkom) Ratten (Sprague Dawley) mit einem mittleren Körpergewicht von 135 g eingesetzt. Am 5. Tag nach Implantation des Tumors (0,5 ml Yoshida-Ascites-Suspension in den re. Oberschenkel i.m.) erhielten 8 Tiere eine Dosis von 30 µg Vincristin/kg Körpergewicht in 0,3 ml wässriger Lösung intraperitoneal appliziert. 8 Stunden nach der Vincristingabe erfolgte bei den Tieren zusammen mit 8 nicht vorbehandelten Ratten eine intravenöse Gabe von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht in die Schwanzvene. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten, die ein getrenntes quantitatives Sammeln von Urin und Kot ermöglichten. Neben diesen therapierten Versuchstieren wurden 8 unbehandelte Tumorratten als Kontrolltiere unter sonst gleichen Bedingungen gehalten. Alle Tiere wurden täglich auf Allgemeinzustand, Freßverhalten, Haarausfall etc. überprüft und das Tumorwachstum durch Tastbefund kontrolliert. Am 5.Tag nach Cyclophosphamid-Gabe (10. Tag nach Tumorimplantation) bzw. am 7. Tag nach Tumorimplantation erhielt jedes Tier der beiden Versuchsgruppen bzw. der Kontrollgruppe 2 Stunden vor Tötung 20 µCi ^{14}C-Desoxy-Thymidin (Firma Amersham - Buchler, Braunschweig) in 0,35 ml physiologischer NaCl-Lösung in die Schwanzvene injiziert; die vorgezogene Tötung und Desoxy-Thymidin-Applikation bei den Kontrolltieren erfolgte auf Grund der Gefahr eines Tumordurchbruches.
Die Tötung aller Tiere erfolgte nach Herzpunktion in Äthernarkose durch dekapitieren. Folgende Organe wurden entnommen: Tumor, Muskel (kontralateraler Oberschenkel),

Leber, Milz, Herz, Knochen (Femur), Dünndarm (mit Inhalt), Dickdarm (ohne Inhalt, gewaschen), Lunge und Niere. Die Organe wurden mit einem Wiegemesser zerkleinert. Ein aliquoter Teil wurde anschließend mit einem Ultra-Turrax (Firma Jahnke und Kunkel, Staufen i. Br.) homogenisiert. Die Aufbewahrung der Organproben erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C.

Die Urine wurden in 24 Stunden-Fraktionen bis zur Tötung 120 h p.i. gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

Der Kot wurde wegen des zu erwartenden geringen Aktivitätsgehaltes (41) nicht analisiert.

2.3. Probenaufbereitung zur Radioaktivitätsbestimmung

100 µl der Serum- und Urinproben aus den Tierexperimenten wurden zur Bestimmung des Anteils an gebildetem $^{3}H_2O$ als Stoffwechselendprodukt der tritiierten Chloräthylgruppen vor und nach Gefriertrocknung mit 0,5 ml Hyamin-Hydroxid aufgenommen und nach vollständiger Lösung mit 15 ml Szintillationslösung (5,5 g PPO + 0,2 g POPOP + 0,2 l Äthanol + Toluol ad 1 l) versetzt.

Aliquote Teile der Homogenate der zu untersuchenden Organe wurden 3mal mit 50 %igem Methanol (2 % Trichloressigsäure) extrahiert (g/10v). In 1 ml der vereinigten, gewogenen Extraktionslösungen wurde nach Versetzen mit 10 ml Szintillationslösung (Unisolv I) die ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität analysiert und der extrahierbare Anteil (%) aus dem jeweiligen Organ berechnet. Die Extraktionsrückstände wurden auf Filterpapier eingewogen und in einem Verbrennungsautomaten (Firma Packard, Sample Oxidizer, Modell 305) zu $^{3}H_2O$ und $^{14}CO_2$ verbrannt. Die aktiven Verbrennungsprodukte wurden kondensiert ($^{3}H_2O$) bzw. an Äthanolamin gebunden ($^{14}CO_2$) und getrennt in den entsprechenden Szintillationslösungen aufgenommen und zur Radioaktivitätsbestimmung gebracht. Die Effektivität des Gerätes wurde durch Verbrennen von Standardproben überprüft und Memory-Effekte durch Leerverbrennungen weitgehend ausgeschaltet.

2.4. Bestimmung der DNS- und RNS-Gehalte und der spezifischen Alkylierungen der Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des DNS- und RNS-Gehaltes einzelner Organe wurden aliquote Teile der mit dem Wiegemesser zerkleinerten Organe (50 - 100 mg) in Anlehnung an das Verfahren nach KAYSER (25) in 6 ml entsalztem H_2O im Eisbad gepottert und nach Zusatz von 3 ml 0,6 n $HClO_4$ in einer Kühlzentrifuge (Highspeed 18,MSE) 20 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Extraktion von freien Vorläufern nicht gebundener Cyclophosphamid-Metabolite und biologischem Material wurde insgesamt 6mal mit 3 ml 0,2 n $HClO_4$ in Kälte wiederholt. Durch Umdrehen der Zentrifugengläser wurde der Rückstand weitgehend von der Extraktionslösung befreit und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Rückstand wurde mit 3 ml 1 n KOH versetzt und 60 min bei 37° C inkubiert. Nach Abkühlen wurde der basische Überstand durch Zugabe von 1,5 ml kalter 2 n $HClO_4$ neutralisiert und 20 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Nach zweimaligem Nachwaschen mit 3 ml 0,1 n $HClO_4$ wurden die RNS-Nucleotide enthaltenden Überstände vereinigt und bis zur weiteren Analyse kühl aufbewahrt. Der Rückstand wurde in 2 ml 1 n $HClO_4$ resuspendiert und über 30 min bei 70° C inkubiert. Nach Zentrifugieren und Dekantieren wurde diese Behandlung des Rückstandes unter 10 min Inkubationszeit bei 70° C wiederholt. Die beiden hydrolysierte DNS enthaltenden Dekantate wurden vereinigt. Jeweils 1 ml der DNS- und RNS-Hydrolysate wurden zur Messung der ^{3}H- und ^{14}C-Radioaktivität in Szintillationsfläschchen pipettiert und mit 10 ml Unisolv I versetzt. Der säureunlösliche Rückstand (Proteine und subzelluläre Organellen, Membranen) wurde nach 3maligem Nachwaschen mit jeweils 3 ml

entsalztem H_2O auf Filterpapier eingewogen und nach Gefriertrocknung im Verbrennungsautomaten und anschliessender Radioaktivitätsbestimmung auf ^3H und ^{14}C-Aktivität analysiert.

Die quantitative Bestimmung der DNS erfolgte in Anlehnung an das von DIEHL beschriebene Verfahren (8). Die Konzentrationen an DNS-Nucleotiden in den Hydrolysaten wurden photometrisch (Spektralphotometer, Firma Zeiss, Modell PM 6) über die Farbreaktion mit Diphenylamin bei 600 nm, 1,0 cm Schichtdicke und 3 ml Testvolumen bestimmt. Dazu wurden nacheinander 0,2 ml Probenlösung, 0,8 ml 0,5 n $HClO_4$ und 2 ml Diphenylamin-Reagenzlösung (20 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig, 1,5%ige H_2SO_4 und 16 mg Acetaldehyd in 1 ml entsalztem Wasser, Mischungsverhältnis 200 : 1)in Teströhrchen pipettiert, gut gemischt und 20 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Messungen der Extinktion erfolgten gegen ein entsprechendes Gemisch von $HClO_4$ Diphenylaminreagenz-Lösung. Die DNS-Konzentration wurde aus einer erstellten Eichkurve berechnet. Die Kalibrierungskurve umfaßte den Bereich von 2 - 50 µg hydrolysierte DNS/ml und war aus einer DNS-Stammlösung aus Heringssperma (Firma Serve, Heidelberg) nach saurer Hydrolyse erstellt worden. Die Bestimmung des RNS-Gehaltes im RNS-Hydrolysat erfolgte photometrisch bei 276 nm,1,0 cm Schichtdicke (Quarzküvette) und 3 ml Testvolumen, bestehend aus 0,2 ml Hydrolysat und 2,8 ml 0,1 n $HClO_4$ (9). Gemessen wurde gegen eine wässrige $HClO_4$-Lösung (0,2 ml H_2O + 2,8 ml 0,1 n $HClO_4$). Aus der Extinktion wurde die jeweilige Konzentration an RNS aus einer vorher erstellten Eichkurve mit hydrolysierter Kälber - thymus-RNS berechnet. Kontrollmessungen der reinen DNS- und RNS-Hydrolysate erfolgten bei Wellenlängen von 265 und 232 nm, um wertbare Proteingehalte in den Hydrolysaten auszuschließen.

2.5. Radiochromatographie

Die gewonnenen Organextrakte der je 8 Tiere einer Versuchsgruppe wurden gepoolt. Nach Entnahme aliquoter Teile von den vereinigten Lösungen (1 ml) und Gefriertrocknung erfolgte die Aufnahme im kleinstmöglichen Volumen (50%igem Methanol) zur chromatographischen Analyse. Die Urinsammelfraktionen beider Versuchsgruppen wurden nach Poolen ohne weitere Aufbereitung chromatographiert. 50 - 100 µl der jeweiligen Probenlösung wurden auf DC-Fertigplatten (Kieselgel 60/Kieselgur 254 F, 0,25 mm Schichtdicke) aufgetragen und mit dem Laufmittelgemisch n - Butanol : Methyläthylketon : H_2O : Methanol = 4 : 2 : 3 : 1 bei 4° C bis zu einer Laufmittelfront von 9 cm über ca 90 min chromatographiert. Nach Trocknung wurden die mit der Laufmittelfront gewanderten lipophilen Produkte mit dem unpolaren Laufmittelgemisch Chloroform : Aceton = 1 : 2 bis zu einer Laufmittelfront von 17 cm über ca 40 min bei 4° C aufgetrennt. Mit einem halbautomatischen Gerät wurde die Schicht von den getrockneten Platten in 0,2 cm Breite in Meßfläschchen geschabt und mit 10 ml Szintillationslösung (22 g Cabosil + 5,5 g PPO + 0,2 g POPOP + 0,1 l Methanol + Toluol ad 1 l) versetzt und die Aktivität in den Probenfläschchen bestimmt.

2.6. Radioaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der ^{3}H- und ^{14}C-Radioaktivität in den aufbereiteten Meßproben wurde in einem 3 Kanal-Flüssig-Szintillationsspektrometer (Modell 3390 und 3380, Firma Packard) mit automatischer Korrektur der Löscheffekte über das Kanalverhältnis des externen Standards und Datenausgabe in absoluter Aktivität (dpm) bestimmt. Die in Frage kommenden Quench-Bereiche wurden unter laufender Kontrolle mit internem Standard (^{3}H- und ^{14}C-Toluol) geeicht. Die Meßzeiten waren so ausgewählt, daß der relative Fehler der Einzelmessung unter 2 % lag.

2.7. Auswertung der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der ^{3}H- und ^{14}C-Aktivitätsbestimmungen in Serum, Organen und Rückständen nach Extraktion wurden die spezifischen Aktivitäten (dpm/g bzw. ml) berechnet. Zur Korrektur unterschiedlicher Körpergewichte (KG) bei gleicher Dosierung erfolgte eine Umrechnung in relative Konzentrationen (%) nach der Formel

$$\text{rel. Konz.} = \frac{\text{spez. Akt. (dpm/g bzw. ml)} * \text{KG(g)} * 100}{\text{Aktivitätsdosis (dpm)}} \%$$

Für die aus der ^{3}H-Aktivität berechneten Konzentrationen an Cyclophosphamid bzw. Metaboliten entsprechen 100 % relative Konzentration der pro g bzw. kg Tier applizierten Dosis in µg bzw. mg, während für die ^{14}C-Aktivität 100 % relative Konzentration die pro g Tier als Desoxy-Thymidin applizierte ^{14}C-Aktivität in dpm entsprechend repräsentiert. Aus den Einzelergebnissen

für jedes Tier der beiden Versuchs- und der Kontrollgruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und Konzentrationsunterschiede zwischen den Gruppen mit dem inhomogenen t-Test nach STUDENT auf biologische Signifikanz überprüft.

Die in den Urinsammelfraktionen analysierten ^{3}H-Aktivitäten wurden in prozentuale Dosisanteile umgerechnet. Aus der Differenz der Analysenergebnisse in Urin- und Serumproben mit und ohne Gefriertrocknung wurde die Bildungsrate an $^{3}H_2O$ als Stoffwechselendprodukt der tritiierten Chloräthylgruppen in % der Dosis berechnet, wobei ein Körperwasseranteil von 60 % des Körpergewichtes zu Grunde gelegt wurde.

In den Radio-DC wurden die Summen der Aktivitätsgipfel und ihr prozentualer Anteil an der aufgetragenen Radioaktivität sowie die Rf-Werte berechnet, wobei die Ergebnisse der parallel gefahrenen Chromatogramme gemittelt wurden.

Bei allen Tieren nach ^{3}H-Cyclophosphamid-Gabe wurden die nach Töten der Tiere sorgfältig herausgeschälten Tumoren gewogen und die Mittelwerte und Standardabweichungen für die jeweilige Gruppe berechnet.

Aus den ^{3}H-Aktivitätsbestimmungen in DNS- und RNS-Hydrolysaten der analysierten Organe wurde die über die ^{3}H-Aktivität ermittelte spezifische "Alkylierung" pro mg DNS bzw. RNS berechnet. Unter Bezug auf die molaren Konzentrationen wurde die Anzahl der Nucleotide pro Einzelalkylierung ermittelt.

Die relativen Konzentrationen an Desoxy-Thymidin in den analysierten Organen bezogen auf die spezifischen Aktivitäten wurden in Indices umgerechnet, d.h. die Werte der Kontrollgruppen wurden gleich 100 % und die der Versuchstiere hierzu in Beziehung gesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung chromatographisch analysierter Substanzen

Das angewandte Chromatographiesystem erlaubte ein Auftrennen der mehr hydrophilen (Rf 0 - 0,55) und der mehr lipophilen (Rf 0,55 - 0,95) ^{3}H-markierten Substanzen durch das biphasische Chromatographiesystem auf einer DC-Platte. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Reaktionsschritte in der Aktivierung und Metabolisierung in vivo (vergl.1, 2, 5, 10, 21, 23, 45, 49).

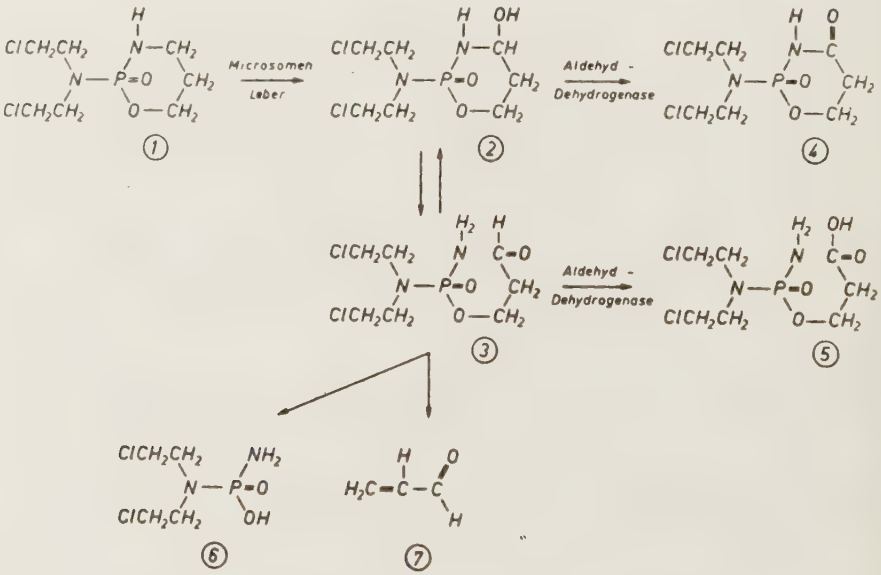


Abb. 2: Aktivierung und Giftung von Cyclophosphamid(vgl.2)
1) Cyclophosphamid, 2) 4-Hydroxy-Cyclophosphamid,
3) Aldophosphamid 4) 4-Keto-Cyclophosphamid,
5) Carboxyphosphamid, 6) NH-Lost-phosphorsäure-diamid
7) Acrolein

Demnach wird die Aktivierung des Cyclophosphamid durch eine Hydroxylierung des C_4-Atoms in Oxazaphosphorinring (46) zum primär aktiven Produkt, dem 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, eingeleitet. Das ringoffene, mit 4-Hydroxy-Cyclophosphamid im Gleichgewicht stehende Tautomere Aldophosphamid wird durch Abspalten von Acrolein bzw. Acrylsäure in das starke Alkylanz NH-Lost-phosphorsäure-diamid überführt, wobei dieses Agens als die eigentliche Wirkform des Cyclophosphamid angesehen wird. Aus den beiden tautomeren Substanzen können durch Dehydrierung das 4-Keto-Cyclophosphamid bzw. das Carboxyphosphamid entstehen, die beide auf Grund ihrer geringen zytostatischen Wirkung als stabile Entgiftungsprodukte angesehen werden. Im Gegensatz zu diesen lassen sich die Primär- und Sekundär-Metabolite, das 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das Aldophosphamid sowie das NH-Lost-phosphorsäure-diamid wegen ihrer Labilität und Instabilität und bedingt durch die zeitaufwendige Probenaufbereitung und das wasserhaltige Chromatographiesystem, das wir angewendet haben, in unserem chromatographischen System nicht nachweisen.

Die Identifizierung der typischen Rf-Werte richtete sich nach Arbeiten von SCHAUMLÖFFEL und Mitarbeitern (40, 41, 42). Über die im Chromatographiesystem aufgetrennten Substanzen bzw. Substanzgruppen können mit dem erforderlichen Vorbehalt folgende Aussagen gemacht werden.

Rf 0: Hierbei handelt es sich um nicht auftrennbare Substanzen, die hauptsächlich aus Reaktionsprodukten der Metabolite des Cyclophosphamid mit niedrigmolekularen Peptiden bestehen.

Rf 0,1 und 0,2: Hierüber liegen noch keine sicheren Strukturanalysen vor. Vermutet werden primäre Hydrolyseprodukte des Cyclophosphamid sowie Derivate des NH-Lost-phosphorsäure-diamid bzw. des NH-Lost.

Rf 0,3: Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Reaktionsprodukt des 4-Hydroxy-Cyclophosphamid mit der SH-Gruppe eines Biomoleküls (4-S-R-Mercapto-Cyclophosphamid). Das Produkt zeigt anionischen Charakter und wurde durch Referenzanalyse und massenspektrometrische Untersuchungen charakterisiert.
Rf 0,4: Der in dieser Zone liegende Metabolit konnte ebenfalls identifiziert werden, es handelt sich dabei um ein Konjugat von NH-Lost-phosphorsäure-diamid mit einer höhermolekularen biologischen Substanz. Dieses Produkt zeigt kationischen Charakter (50).
Rf 0,5: Bei dieser Substanz handelt es sich um das Carboxyphosphamid.
Rf 0,55: Unter diesem Rf-Wert läuft eine unbekannte, bisher nicht identifizierte Substanz.
Rf 0,6: Die Struktur des unter diesem Rf-Wert laufenden Metaboliten ist geklärt. Dieser Bereich ist dem 4-Keto-Cyclophosphamid zuzuordnen.
Rf 0,7:Durch diesen Rf-Wert wird das Cyclophosphamid charakterisiert.
Rf 0,8: Bei dieser Substanzgruppe handelt es sich wahrscheinlich um ein Derivat des Cyclophosphamid mit intaktem Oxazaphosphorinring. Sowohl hier, wie auch beim nachfolgenden Rf-Wert kann das Vorliegen eines Diastereomeren des Cyclophosphamid nicht ausgeschlossen werden.
Rf 0,9: Über die Struktur dieses stark lipophilen Produktes kann noch nichts ausgesagt werden.

Da vereinzelt Radioaktivitätsgipfel mit unbedeutend kleinen prozentualen Anteilen neben den eben aufgeführten Rf-Werten auftraten, wurden diese bei der Auswertung der Chromatogramme dem nächstliegenden Aktivitätsgipfel zugeordnet.

Die Substanzen mit den Rf-Werten 0,3 , 0,4 und 0,5 reagieren bei entsprechenden Konzentrationen im Sprühtest mit 4- (4 nitro-benzyl) - Pyridin (NBP) (14) positiv und müssen daher als potentielle Alkylantien angesprochen werden.

3.2. Renale Ausscheidungen an Cyclophosphamid und Metaboliten nach intravenöser Stoßtherapie mit und ohne Vincristin Vorbehandlung

Die in den 24 h-Sammelfraktionen und insgesamt bis 120 h nach Cyclophosphamid-Stoßtherapie mit und ohne Teilsynchronisation mit dem Urin ausgeschiedenen prozentualen Dosisanteile ($M \pm S$) sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Neben der Gesamtausscheidung sind in der Tabelle die aus den chromatographischen Analysenergebnissen berechneten prozentualen Dosisanteile für die über ihre Rf-Werte charakterisierten Substanzen aufgeführt.

Die Gesamtausscheidung der mit Vincristin vorbehandelten Tiere betrug bis 120 h nur 60 % der Dosis. Bereits nach 24 h waren schon 92 % dieser Menge ausgeschieden, während die fehlenden 8 % an der gesamt ausgeschiedenen Menge in den folgenden Sammelfraktionen eliminiert wurden. Bei der nicht vorbehandelten Gruppe fällt eine wesentlich höhere renale Ausscheidung auf. Sie betrug 86 % der Dosis. Auch hier wurden 95 % der renalen Gesamtausscheidung bis 120 h in den ersten 24 h ausgeschieden, was auf eine hohe Funktionsleistung der Rattenniere schließen läßt. Die Unterschiede in den Ausscheidungsgrößen beider Gruppen sind biologisch hoch signifikant ($p < 0,0005$).Diese unterschiedlichen renalen

Ausscheidungsgrößen der beiden Versuchsgruppen erfahren durch die Einbeziehung der Bildungsrate an Tritiumwasser als Stoffwechselendprodukt der titriierten Chloräthylgruppen mit 6,6 ± 1,36 % in der vorbehandelten und 6,9 ± 1,93 % der Dosis in der nicht vorbehandelten Gruppe keine Veränderungen. Dadurch erhöht sich die Ausscheidungs- und Abbaurate in der teilsynchronisierten Gruppe auf 66,6 % der Dosis, in der nur mit Cyclophosphamid behandelten Gruppe auf 92,9 % der Dosis. Unter der Annahme enteraler Ausscheidungsgrößen von 5 - 6 % der Dosis, wie sie von SCHAUMLÖFFEL und Mitarbeitern (41) im gleichen Untersuchungszeitraum ermittelt wurden, ergibt sich für die nicht vorbehandelte Tiergruppe eine gesamte Ausscheidungs- und Abbaurate von 98 %, was der analysierten Restkonzentration im Organismus der Ratte 120 h nach Cyclophosphamid-Injektion entspricht (siehe Kapitel 3.3.). Für die mit Vincristin vorbehandelte Gruppe bleibt eine auffällig eingeschränkte renale Ausscheidungsgröße. Schließt man einen Analysenfehler aus, so kann möglicherweise die renale Minderausscheidung in dieser Gruppe auf eine eingeschränkte Rückresorption von Cyclophosphamid-Metaboliten aus dem enterohepatischen Kreislauf zurückgeführt werden, was mit einer höheren enteralen Ausscheidung parallel laufen würde. Mit Vorbehalt kann somit die negative Radioaktivitätsbilanz auf die nicht analysierten enteralen Ausscheidungen zurückgeführt werden.

Entsprechend den Gesamtausscheidungen finden sich die höchsten Ausscheidungsraten an Cyclophosphamid und einzelnen Metaboliten in der ersten 24 h-Sammelfraktion. In den Ausscheidungen der mit Vincristin vorbehandelten Versuchstiere konnten die Metabolite Rf 0,2 und Rf 0,9 im gesamten Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen

werden. In den Ausscheidungen dieser Versuchsgruppe fanden sich 4-Keto-Cyclophosphamid (Rf 0,6)und die Metabolite Rf 0,55 und Rf 0,4 sowie die Substanzgruppe Rf 0 - 0,1 nur bis 72 bzw 96 h nach Applikation. Carboxyphosphamid (Rf 0,5) wurde im Untersuchungszeitraum mit etwa 20 % der Dosis renal ausgeschieden und erwies sich somit als Hauptmetabolit. Bei Gesamtausscheidungsgrößen von ca 10 % für Cyclophosphamid (Rf 0,7) und den Metabolit Rf 0,8 lagen diese für die restlichen chromatographisch analysierten Substanzen unter 10 %.

Die höheren renalen Eliminationsgrößen in der nicht vorbehandelten Gruppe führen zu entsprechend höheren Ausscheidungsraten an einzelnen nachweisbaren Substanzen. So zeigte der Metabolit Carboxyphosphamid (Rf 0,5) mit 31,9 % der Dosis eine ausgesprochen hohe Bildungs- und Eliminationsrate. In Übereinstimmung mit der Literatur (41) wird unverändertes Cyclophosphamid (Rf 0,7)mit dem sehr hohen Dosisanteil von 20 % und, wie auch alle anderen nachweisbaren Abbauprodukte des Zytostatikums, vorwiegend in den ersten Sammelfraktionen renal ausgeschieden. Von 72 h p.i. an konnten in den folgenden Sammelfraktionen nur noch Cyclophosphamid (Rf 0,7), Carboxyphosphamid (Rf 0,5) und die Metabolite Rf 0,8, Rf 0,3 und Rf 0,2 mit ausgesprochen niedrigen prozentualen Dosisanteilen analysiert werden. Bei dieser Gruppe wurden die Metabolite Rf 0,2 und Rf 0,9, die in den Urinausscheidungen der vorbehandelten Gruppe nicht nachweisbar waren, mit Dosisanteilen von 4 - 5 % im Untersuchungszeitraum eliminiert.

Die renale Minderausscheidung in der teilsynchronisierten Versuchsgruppe ist vorwiegend bzw. ausschließlich auf die verminderten Ausscheidungen an Cyclophosphamid und Carboxyphosphamid zurückzuführen. Liegt

unter der Vincristin Vorbehandlung eine eingeschränkte Rückresorption aus dem enterohepatischen Kreislauf vor, so wäre der Schluß erlaubt, daß in dieser Gruppe Cyclophosphamid vermehrt aktiviert bzw. metabolisiert wird und die Deaktivierungsprodukte, vor allem Carboxyphosphamid vermehrt biliär ausgeschieden werden bzw. daß Cyclophosphamid selbst einer ebenfalls vermehrten enteralen Ausscheidung im Vergleich zur nicht vorbehandelten Gruppe unterliegt.
Es kann ebenso die Möglichkeit bestehen, daß in der vorbehandelten Gruppe Cyclophosphamid vermehrt aktiviert wird bzw. eine eingeschränkte Aktivierung des Aldophosphamids zum Carboxyphosphamid vorliegt.

Tabelle 1: Renale Ausscheidungen in Sammelfraktionen an Cyclophosphamid (CPM) und äquimolaren Metaboliten in % der Dosis (M ± S) bis zu 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg KG bei der Ratte (n = 8) mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/kg KG.

Urin Sammelfraktion Stunden	% Dosis	Ausscheidung an Rf-charakteristischen Substanzen in % von Dosis									
		0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1 - 0
- VCR + CPM -											
0 - 24 h	55,16 ± 7,6	-	8,8	8,8	4,5	3,4	18,2	2,7	5,5	-	3,3
24 - 48 h	2,01 ± 1,1	-	0,3	0,4	0,1	0,1	0,5	-	0,5	-	0,1
48 - 72 h	1,34 ± 0,6	-	0,3	0,4	-	-	0,3	-	0,1	-	0,1
72 - 96 h	1,00 ± 0,8	-	0,2	0,3	0,1	-	0,1	-	0,3	-	-
96 -120 h	0,47 ± 0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,1	-	-
0 -120 h	60,00 ± 6,9	-	9,7	10,0	4,7	3,5	19,2	2,7	6,5	-	3,5
- CPM -											
0 - 24 h	80,86 ± 4,4	3,8	6,5	18,2	5,7	2,2	30,6	1,8	2,6	4,4	5,1
24 - 48 h	2,86 ± 1,0	0,3	0,2	0,5	0,3	-	0,8	0,4	-	0,1	0,1
48 - 72 h	0,85 ± 0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,3	0,1	-	0,2	-
72 - 96 h	0,63 ± 0,2	-	0,2	0,1	-	-	0,1	-	-	0,1	-
96 -120 h	0,47 ± 0,1	-	-	0,1	-	-	0,1	-	0,2	-	-
0 -120 h	85,67 ± 4,1	4,2	7,0	19,1	6,1	2,2	31,9	2,4	2,8	4,8	5,2

3.3. Spezifische Organkonzentrationen an Cyclophosphamid und Metaboliten 120 h nach intravenöser Stoßtherapie mit und ohne Vincristin Vorbehandlung

In Tabelle 2 sind die in Serum und Organen der Ratte ermittelten Konzentrationen 120 h nach Stoßtherapie mit 30 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht mit und ohne Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin/kg Körpergewicht als Mittelwerte ($M \pm S$) in relativen Größen aufgeführt.

Bei der Monotherapie zeigten sich zwischen den Organen teilweise signifikante Unterschiede in den spezifischen Konzentrationen. Die höchste relative Konzentration lag mit über 5 % in den Nieren. Der Muskel mit 2,64 % sowie die Organe Tumor, Leber, Milz und Lunge wiesen eine deutlich geringere relative Konzentration auf. Während die Konzentrationsunterschiede zu den Nieren für Tumor, Leber und Lunge biologisch hoch signifikant waren ($p < 0{,}0005$), müssen die Unterschiede der Konzentrationen in Tumor, Leber, Milz und Lunge zueinander auf Grund ihrer Streuung als zufällig erachtet werden. Die analysierte Konzentration im Dünndarm mit 0,89 % läßt eine deutliche Abstufung zu dieser mittleren Organgruppe erkennen. Der Unterschied ist mit $p < 0{,}025$ signifikant. Die niedrigste Konzentration konnte im Knochen ermittelt werden. Sie betrug 0,69 %.
Die gleichen biologisch abgesicherten Konzentrationsunterschiede der einzelnen Organe zueinander konnten auch in der teilsynchronisierten Versuchsgruppe gefunden werden. Die Niere wies die höchste relative Konzentration mit über 5 % auf. In Tumor, Leber, Milz, Lunge und Herz fanden sich einheitliche Konzentrationen, deren mittlerer Unterschied zur Niere mit $p < 0{,}025$ signifikant war. Die niedrigste relative Konzentration wurde auch hier im Knochen mit 0,74 % gefunden.

In der nicht vorbehandelten Gruppe ergaben sich Anreicherungsfaktoren für die analysierten Organkonzentrationen gegenüber der Serumkonzentration von 24,8 für die Nieren und von im Mittel 6,7 für die Organe Tumor, Leber, Milz und Lunge. Den niedrigsten Anreicherungsfaktor zeigte der Knochen mit 3,28. Bei der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe lagen die Anreicherungsfaktoren zwischen 21,04 (Nieren), 9,83 (mittlere Organgruppe), 11,86 (Tumor) und 2,96 (Knochen). In beiden Versuchsgruppen lagen die relativen Konzentrationen aller analysierten Organe gesichert höher als die entsprechenden Serumkonzentrationen mit nur 0,21 bzw.0,25 % ($p < 0,0001$, Knochen gegenüber Serum).

Hervorgehoben werden muß, daß sich die Organverteilung in beiden Gruppen in den Relationen auffällig gut entspricht, daß aber in der teilsynchronisierten Gruppe die analysierten Konzentrationen in Tumor ($p < 0,05$), Leber ($p < 0,025$, Milz ($p < 0,005$ und Lunge ($p < 0,01$) signifikant höher lagen als in der nicht mit Vincristin vorbehandelten Gruppe. Bei statistisch nicht gesicherten Konzentrationsunterschieden zwischen Organen beider Versuchsgruppen, wie bei Muskel und Dünndarm, zeigt sich jedoch die Tendenz höherer Konzentrationen in der vorbehandelten Gruppe, was nicht für Nieren, Knochen und Serum gilt.

Tabelle 2: Relative Konzentrationen (%) in Serum und Organen (M ± S) der Ratte (n = 8) 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/ kg KG mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/ kg KG

Organ	rel. Konz. (%) - CPM -	rel. Konz. (%) - VCR + CPM -
Serum	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,07
Tumor	1,32 ± 0,23	2,73 ± 0,76
Dickdarm	+) n.b.	1,09 ± 0,18
Dünndarm	0,89 ± 0,15	1,11 ± 0,18
Leber	1,66 ± 0,35	2,70 ± 0,22
Nieren	5,22 ± 0,61	5,26 ± 0,79
Milz	0,89 ± 0,19	2,22 ± 0,22
Lunge	1,56 ± 0,22	2,37 ± 0,18
Muskel	2,64 ± 0,70	3,55 ± 0,40
Herz	+) n.b.	2,27 ± 0,35
Knochen	0,69 ± 0,17	0,74 ± 0,11

+) n.b. nicht bestimmt (technischer Defekt)

Aus den relativen Konzentrationen in den analysierten Organen beider Versuchsgruppen läßt sich keine besondere Affinität des Tumors für Cyclophosphamid bzw. äquimolare Metabolite ableiten. Ein onkostatischer Effekt zeigte sich aber in einer deutlichen Proliferationshemmung des Tumors. Der Unterschied der mittleren Tumorgewichte (TG) der beiden behandelten Gruppen zu der unbehandelten Kontrollgruppe (TG 2,53 ± 0,57 g) ist mit $p \leq 0,05$ für die reine Stoßtherapie-Tiergruppe (TG 1,21 ± 0,47 g) und mit $p < 0,025$ für die teilsynchronisierte Versuchsgruppe (TG 0,90 ± 0,32 g) signifikant. Die Tendenz niedriger Tumorgewichte bei der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe gegenüber der nicht vorbehandelten könnte in Relation zu den signifikanten Unterschieden in der spezifischen Konzentration der Tumoren beider Versuchsgruppen an Cyclophosphamid und Metaboliten gesehen werden.

Die Größen der nicht extrahierbaren Konzentrationsanteile aus den gepoolten Organhomogenaten und deren radiochromatographisch analysierte prozentuale Verteilung auf Cyclophosphamid und die über ihre Rf-Werte charakterisierten Metabolite sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Ohne auffällige Unterschiede liegen die Extraktionsgrößen in den analysierten Organen beider Gruppen in gleichen Größenordnungen und nehmen für die Organe Milz, Tumor, Dünndarm, Nieren, Leber und Dickdarm Werte zwischen 50 und 70 % ein (niedrigster Wert Milz, höchster Wert Leber). Die niedrigsten Extraktionswerte fanden sich in Knochen, Lunge und Muskel mit etwa 30 %.

Diese Größen nicht extrahierbarer Restkonzentrationen lassen darauf schließen, daß in Niere, Milz, Leber und Tumor vermehrt Reaktionen von primären und sekundären

Metaboliten des Cyclophosphamid mit Biomolekülen in Form von Alkylierungen bzw. Fixierungen stattgefunden haben bei deutlich geringeren Reaktionen dieser Art in den analysierten Organen. Diese teilweise niedrigen Extrahierbarkeiten zeigen an, daß die Restkonzentration in den Organen am 5. Tag nach Injektion zu mehr oder weniger großen Teilen auf Reaktionen mit biologischem Material zurückzuführen sind.

Wie aus den radiochromatographischen Analysenergebnissen hervorgeht, sind am 5. Tag nach Cyclophosphamid-Injektion in beiden Behandlungsgruppen noch wertbare Konzentrationsanteile an Cyclophosphamid (Rf 0,7) in den Organextrakten von Leber und Lunge, bei der nicht vorbehandelten Gruppe auch in der Milz, auffällig hoch nachweisbar. Abgesehen von Niere, Lunge und Dickdarm zeigen die übrigen Organe ihre höchsten Konzentrationsanteile in den Extrakten im Bereich Rf 0 - 0,1. Als auffällig hoch müssen auch die Konzentrationsanteile der lipophilen Abbauprodukte (Rf 0,8 und Rf 0,9) in den Organen Dünndarm, Dickdarm und Milz sowie auch die hohen Carboxyphosphamid-Konzentrationsanteile in Lunge, Nieren, Leber und Dickdarm angesehen werden.

Bei gleichen Extraktionsgrößen zeigte sich, daß besonders auffällig in der Lunge die Anteile an Carboxyphosphamid und Cyclophosphamid in der reinen Cyclophosphamid-Gruppe deutlich höher lagen als in der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe, was auch für Niere, Milz und Leber in abgeschwächter Form gilt. Auf Grund der höheren relativen Gesamtkonzentrationen (%) ergab sich eine absolute Konzentration an Cyclophosphamid in den Organextrakten bei der vorbehandelten Gruppe von 22,68 ng/g Leber und 9,87 ng/g Lunge, während bei den

nicht teilsynchronisierten Tieren die absolute Konzentration in der Leber 15,18 ng/g, in der Lunge 22,4 ng/g und in der Milz 18,76 ng/g Organ betrug. Im Tumorextrakt beider Behandlungsgruppen konnte kein Cyclophosphamid nachgewiesen werden. An absoluten Konzentrationen an Carboxyphosphamid in den Organextrakten fanden sich am 5. Tag nach Injektion bei der vorbehandelten Gruppe im Tumor 61,86 ng/g, in der Lunge 80,98 ng/g, in der Leber 166,95 ng/g und in der Niere 317,5 ng/g. Dem gegenüber stehen Konzentrationen von 60,08 ng/g im Tumor, 42,83 ng/g in der Lunge, 124,78 ng/g in der Leber und 359,74 ng/g in der Niere bei der nur mit Cyclophosphamid behandelten Gruppe.

Die Metaboliten Rf 0,55, Rf 0,4 und Rf 0,2 waren bei beiden Versuchsgruppen in keinem Organextrakt nachweisbar.

Die hohen Organkonzentrationsanteile im Bereich Rf 0-0,1 in den Extrakten der Organe, die als Reaktionsprodukte von Metaboliten des Cyclophosphamid mit biogenen Substanzen anzusprechen sind, machen deutlich, daß die extrahierbare ^{3}H-Aktivität nur mit entsprechender Einschränkung auf Cyclophosphamid und freie äquimolare Metabolite zurückgeführt werden kann.

Tabelle 3: Relative Konzentrationen (%) (M ± S), Extraktionsgrößen (%) sowie Ergebnisse radiochromatographischer Analysen in den Extrakten von Organen der Ratte (n = 8) 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg Cyclophosphamid (CPM)/kg KG mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/kg KG.

Organ	rel.Konz. (%)	Extrakt (%)	Verteilung auf Rf - Werte in %									
			0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1-0
-VCR + CPM-												
Tumor	2,73	47,21 ± 12,90	12,6	-	-	6,5	-	16,0	-	-	-	64,9
Dickdarm	1,09	60,97 ± 5,30	-	37,4	-	6,8	-	33,2	-	-	-	22,6
Dünndarm	1,11	61,08 ± 5,01	10,9	20,0	-	8,9	-	14,0	-	21,6	-	24,6
Leber	2,70	71,82 ± 4,53	1,0	-	3,9	2,0	-	28,7	-	-	-	64,4
Nieren	5,26	59,53 ± 4,86	7,0	4,6	-	-	-	33,8	-	23,7	-	30,8
Milz	2,22	56,05 ± 3,88	39,4	-	-	-	-	16,4	-	-	-	46,0
Lunge	2,37	28,98 ± 1,64	6,2	8,5	4,8	-	-	39,3	-	19,0	-	22,2
Muskel	3,55	28,36 ± 3,00	15,2	-	-	4,8	-	4,3	-	20,5	-	55,3
Herz	2,27	34,03 ± 3,04	-	9,8	-	-	-	-	-	22,5	-	64,7
Knochen	0,74	30,08 ± 1,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+)n.b.

+) n.b. nicht bestimmt (technischer Defekt)

Fortsetzung Tabelle 3: Relative Konzentrationen (%) (M ± S), Extraktionsgrößen (%) sowie Ergebnisse radiochromatographischer Analysen in den Extrakten von Organen der Ratte (n = 8) 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg Cyclophosphamid (CPM)/kg KG mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/kg KG.

Organ	rel.Konz.(%)	Extrakt (%)	Verteilung auf Rf - Werte in % 0,9	0,8	0,7	0,6	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1-0
- CPM -												
Tumor	1,32	53,05 ± 10,87	12,7	-	-	5,9	-	28,6	-	-	-	52,8
Dickdarm	+) n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+) n.b.
Dünndarm	0,89	54,04 ± 17,39	14,6	22,4	-	8,2	-	13,2	-	16,4	-	25,2
Leber	1,66	66,29 ± 5,38	1,8	-	4,6	1,2	-	37,8	-	-	-	54,5
Nieren	5,22	57,72 ± 3,51	9,2	7,0	-	-	-	39,8	-	21,2	-	31,8
Milz	0,89	49,13 ± 3,77	30,2	-	14,3	-	-	15,5	-	-	-	39,0
Lunge	1,56	28,34 ± 2,31	6,3	-	16,9	-	-	56,6	-	-	-	20,2
Muskel	2,64	32,84 ± 7,21	18,4	-	-	2,7	-	-	-	20,9	-	58,0
Herz	+) n.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+) n.b.
Knochen	0,69	28,94 ± 7,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+) n.b.

+) n.b. nicht bestimmt (technischer Defekt)

3.4. Spezifische Konzentrationen und spezifische Alkylierungen von Nukleinsäuren verschiedener Organe nach intravenöser Stoßtherapie von Cyclophosphamid mit und ohne Vincristin Vorbehandlung

Der spezifische Gehalt von DNS und RNS und die diesen beiden Nukleinsäurefraktionen zuzuordnende Cyclophosphamid-Konzentration ("Alkylierungen") in verschiedenen Organen der Ratte sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Daneben sind die spezifischen Alkylierungen (nmol Cyclophosphamid-äquimolarer Metabolite/mg) von DNS und RNS sowie die auf eine Alkylierung entfallende Anzahl an Nukleotiden aufgezeigt, wobei die DNS-Gehalte korrigiert wurden.
Der Gehalt an DNS und RNS ist in mg/g Organ angegeben und spiegelt bei der DNS-Fraktion korrigierte Werte wieder. Da durch die erschöpfende Vorextraktion nicht mehr mit freien Vorläufern (^{14}C-Desoxy-Thymidin) gerechnet werden konnte, wurden über die spezifischen ^{14}C- und ^{3}H-Aktivitäten der DNS, die aus der ^{14}C-Aktivität im RNS-Hydrolysat und im unlöslichen Rückstand gemessen wurden, die entsprechenden Konzentrationen an DNS und Cyclophosphamid-Metaboliten in diesen beiden Fraktionen abgezogen und der DNS-Fraktion zugeordnet.
Die RNS-Gehalte sind möglicherweise durch mitextrahierte Lipide, Peptide, Aminosäuren etc. mit einem gewissen Fehler behaftet, d. h. erscheinen zu hoch. Die in den RNS-Extrakten durchgeführten photometrischen Messungen auf derartige Substanzen im UV-Bereich bei 232 nm und 265 nm ergaben zwar keinen Anhaltspunkt für störende Begleitsubstanzen, doch können auf Grund der Unempfindlichkeit dieses Verfahrens mehr oder weniger geringe Konzentrationen an diesen Stoffen in den Extrakten nicht ausgeschlossen werden.

Daher sind die Konzentrationswerte der RNS mit entsprechendem Vorbehalt zu werten, jedoch sind sie bei Anwendung gleicher Methodik in allen Präparationen zumindest als vergleichende Betrachtung in ihrer Aussage wertbar.

In der Tabelle 4 sind die den DNS- und den RNS-Fraktionen sowie den unlöslichen Rückständen als Reaktionspartner zuzuordnenden Konzentrationen an ^{3}H-Cyclophosphamid bzw. äquimolaren Metaboliten in relativen Größen (%) wiedergegeben. Alle angeführten Werte sind Mittelwerte zweier paralleler Analysenergebnisse aus den gepoolten Organen der einzelnen Versuchsgruppen. Da keine statistische Auswertung durchgeführt werden konnte, können Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Versuchsgruppen nur als Tendenz gewertet werden.

Die höchsten DNS- und RNS-Gehalte fanden sich in beiden Gruppen mit und ohne Vorbehandlung mit Vincristin in Milz und Lunge, gefolgt von Leber und Nieren. Die Unterschiede, die sich in den DNS- und RNS-Konzentrationen dieser Organe bei beiden Gruppen zeigten, waren mit Ausnahme der Milz unauffällig. In diesem Organ konnte ein doppelt so hoher Gehalt an DNS in der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe gefunden werden, bei etwa gleichen RNS-Gehalten in beiden Gruppen. Ein auffälliger Unterschied zeigte sich bei der Betrachtung der Konzentrationswerte im Tumor beider Behandlungsgruppen. Hier wies die nicht vorbehandelte Gruppe einen dreifach höheren DNS-Gehalt und einen doppelt so hohen RNS-Gehalt auf wie die mit Vincristin vorbehandelte Gruppe. Im Hinblick auf einen Therapieeffekt muß der Konzentrationsunterschied im Tumor besonders hervorgehoben werden.

Wenn die in den drei Organfraktionen über die ^{3}H-Aktivität analysierten Konzentrationen an Cyclophosphamid bzw. äquimolaren Metaboliten von uns auf Alkylierungen zurückgeführt werden, so sind wir uns bewußt, daß es sich ebenfalls um Reaktionen anderer Art handeln kann, wie z.B. Fixierungen durch Bildung von Mercapto-Verbindungen mit SH-Gruppen-haltigem biologischem Substrat und 4-Hydroxy-Cyclophosphamid oder um Konjugate der Friedmannsäure (NH-Lost-phosphorsäure-diamid) etc. Wir gebrauchen im folgenden das Wort "Alkylierung" daher mit diesem Vorbehalt. Wenn wir jetzt von relativen Konzentrationen sprechen, ist damit die relative Konzentration in % für die DNS, RNS und den Rückstand/g Organ gemeint (100 % rel. Konz. = 100 nmol Cyclophosphamid bzw. äquimolare Metabolite in der DNA- und RNA-Fraktion und im Rückstand/g Organ).

Bei etwa gleichen relativen Konzentrationen für die DNS und die Rückstandsfraktionen lagen diese für die RNS-Fraktionen in doppelter Größenordnung. Etwa 75 % Anteil der relativen Gesamtkonzentration (%) der drei Fraktionen entfielen somit auf die beiden Nukleinsäurefraktionen. Dies läßt vermuten, daß die Reaktionen von Cyclophosphamid-Metaboliten vorwiegend mit Nukleinsäuren abzulaufen scheinen.

Die höchsten relativen Konzentrationen der beiden Nukleinsäuren zeigten sich in beiden Fraktionen bei den Nieren, gefolgt von Leber, Lunge und Milz. Sie lagen am niedrigsten im Tumor. Bei der Betrachtung der Konzentrationsunterschiede in den drei Fraktionen dieser Organe bei beiden Gruppen zeigte sich, daß die mit Vincristin vorbehandelte Gruppe, mit Ausnahme der Nieren, zu höheren relativen Konzentrationen (%) (1,5 - 2fach höher) tendierte, was auch für den Tumor der vorbehandelten Gruppe gegenüber der reinen Cyclo-

phosphamid-Gruppe gilt. Auffällig ist die höhere relative Konzentration (%) in der RNS-Fraktion der Milz der vorbehandelten Gruppe

Die unterschiedlichen Gehalte an DNS und RNS in mg/g Organ führten in Verbindung mit den relativen Konzentrationen (%) zu den entsprechenden Tendenzen in den Größen der spezifischen Alkylierung (nmol/mg Nukleinsäure). Die spezifischen Alkylierungen von DNS und RNS in den analysierten Organen beider Versuchsgruppen lagen mit Ausnahme des Tumors am höchsten in den Nieren, gefolgt von Leber, Lunge und Milz. Die spezifischen Alkylierungen der Nukleinsäuren der entsprechenden Organe entsprachen sich in beiden Versuchsgruppen auffällig gut. Lediglich der Tumor der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe wies gegenüber der reinen Cyclophosphamid-Gruppe eine etwa 4-fach höhere spezifische Alkylierung der DNS auf, da hier der DNS-Gehalt der vorbehandelten Gruppe nur ein Drittel dem der reinen Cyclophosphamid-Gruppe entsprach. Die relative Konzentration (%) der DNS-Fraktion im Tumor der Vincristin-Gruppe lag in der gleichen Größenordnung wie in Leber und Niere, während die Größe der spezifischen Alkylierung der DNS-Fraktion im Tumor der nicht vorbehandelten Gruppe in der gleichen Größenordnung lag wie Milz und Lunge.

Die angegebenen Werte für die Anzahl der Nukleotide pro Alkylierung lassen noch einmal die minimalen Unterschiede der Alkylierungsraten in den Organen beider Gruppen mit der Tendenz zu leicht höheren Werten bei der vorbehandelten Gruppe erkennen. Während bei der reinen Cyclophosphamid-Gruppe $56{,}0 \cdot 10^3$ DNS-Nukleotide einer Alkylierung im Tumor entsprachen, waren es bei der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe im Tumor nur $11{,}34 \cdot 10^3$ DNS-Nukleotide/Alkylierung.

Demgegenüber entsprachen sich in der DNS-Fraktion die Größen der Nukleotid-Anzahlen in beiden Gruppen in den jeweiligen Organen auffällig gut. Wir fanden somit eine 5-fach höhere Alkylierung in der DNS-Fraktion des Tumors der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe. Gleiches gilt auch mit dem entsprechenden Vorbehalt für die RNS-Fraktion.

Die Umrechnung der spezifischen Alkylierung der DNS und RNS in die Anzahl der DNS- und RNS-Nukleotide/Alkylierung soll auch verdeutlichen, daß, falls es sich wirklich um Alkylierungen handelt, diese Alkylierungsraten bei allen Organen ausgesprochen hoch liegen, da etwa 10^3 bis 10^4 Nukleotide ein Chromosom bilden.

Tabelle 4: Spezifische Gehalte an Nukleinsäuren, relative Konzentrationen (%) an ^{3}H-Cyclophosphamid-äquimolaren Metaboliten in Nukleinsäurefraktionen und Rückständen sowie spezifische Alkylierungen und Anzahl der Nukleotide der Nukleinsäuren pro Alkylierung in Organen der Ratte 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/kg KG mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/kg KG.

Organ	Gehalt mg / g Organ		rel.Konz. (%) / g Organ			spez.Alkylierung n mol/mg		Nucleotide/1 Alkylg	
	DNA	RNA	DNA	RNA	Rückst.	DNA	RNA	DNA x 10^{3}	RNA
-VCR + CPM-									
Tumor	1,01	3,56	0,26	0,65	0,39	0,29	0,20	11,34	16,26
Leber	1,67	6,62	0,57	0,96	0,38	0,38	0,16	8,66	20,62
Lunge	3,65	6,74	0,17	0,33	0,17	0,05	0,05	66,00	61,11
Milz	9,89	16,37	0,44	0,55	0,22	0,05	0,04	67,34	89,19
Niere	1,92	5,81	0,75	1,88	0,81	0,43	0,36	7,64	9,19
- CPM -									
Tumor	3,12	6,54	0,17	0,40	0,14	0,06	0,07	56,00	48,52
Leber	1,25	4,81	0,30	0,61	0,20	0,27	0,14	12,41	23,40
Lunge	3,55	5,43	0,11	0,23	0,10	0,03	0,05	97,06	70,21
Milz	4,81	18,68	0,16	0,19	0,10	0,04	0,01	86,84	300,00
Niere	1,67	4,68	0,60	1,75	0,72	0,39	0,41	8,74	7,95

3.5. Desoxy-Thymidin-Indices in Organen der Ratte nach intravenöser Cyclophosphamid-Stoßtherapie mit und ohne Vincristin Vorbehandlung

In Tabelle 5 sind die ^{14}C-Desoxy-Thymidin-Indices (%) (unbehandelte Kontrollgruppe = 100 % Index) für die analysierten Organe der Versuchstiere 120 h nach intravenöser Applikation von ^{3}H-Cyclophosphamid mit und ohne Vincristin Vorbehandlung aufgezeigt.

In beiden Versuchsgruppen lagen die Indices in Leber und Lunge deutlich unter 100 % bei hoher biologischer Signifikanz im Unterschied zur Kontrollgruppe ($p < 0{,}0005$). Alle übrigen analysierten Organe wiesen Indices über 100 % auf, wobei der Dünndarm als stark proliferierendes Organ den höchsten Wert von mehr als 1000 % aufzeigte. Die mehr oder weniger überhöhten Indices (100 %) verdeutlichen eine überschießende Reaktion in der DNS-Synthese nach Abklingen der Noxe, die besonders im Dünndarm stark erhöht abläuft. Mit Ausnahme von Tumor und Muskel liegen die Desoxy-Thymidin-Indices der übrigen analysierten Organe in beiden Versuchsgruppen in auffällig guter Übereinstimmung. Bei Tumor und Muskel sind dagegen die Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen im Thymidin-Index hoch signifikant gesichert ($p < 0{,}0005$). Wir fanden im Tumor der reinen Cyclophosphamid-Gruppe einen 3-fach höheren Thymidin-Index gegenüber der vorbehandelten Gruppe, während beim Muskel der Desoxy-Thymidin-Index bei der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe doppelt so hoch lag.

Tabelle 5: ^{14}C-Desoxy-Thymidin-Indices (%) in Organen der Ratte (n = 8) 120 h nach i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid (CPM)/kg KG mit und ohne i.p. Vorbehandlung mit 30 µg Vincristin (VCR)/kg KG.

Gruppe	Tumor	Muskel	Milz	Niere	Lunge	Dünndarm	Leber	Dickdarm
- VCR + CPM -	138,5 ± 104,3	544,4 ± 233,3	144,5 ± 60,5	136,7 ± 41,7	28,6 ± 5,5	1166,7 ± 569,4	33,5 ± 24,7	319,7 ± 143,9
- CPM -	353,2 ± 109,1	177,8 ± 77,8	103,8 ± 51,7	136,7 ± 49,4	32,3 ± 13,8	1259,3 ± 643,5	34,5 ± 10,5	+) n.b.
Kontrolle	100,0 ± 26,3	100,0 ± 22,2	100,0 ± 41,7	100,0 ± 29,1	100,0 ± 21,8	100,0 ± 34,2	100,0 ± 40,1	100,0 ± 21,2

+) n.b. nicht bestimmt (technischer Defekt)

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Untersuchungen bestätigen, daß unter den Bedingungen einer partiellen Synchronisation eine Cyclophosphamid-Stoßtherapie zu einer deutlich gesteigerten zytostatischen Wirkung auf den Tumor, aber auch zu erhöhten zytostatischen Reaktionen in kritischen Organen führt, daß aber die zum Teil signifikant erhöhten, auf Reaktionen von Metaboliten mit biologischem Substrat zurückzuführenden Restkonzentrationen am 5. Tag p.i. nur eine geringfügige Erhöhung der Alkylierungsraten von Nukleinsäuren zur Folge hatte; d.h. die Kombinationstherapie führte zwar nicht zu einer Verminderung toxischer Nebeneffekte, jedoch zu einer Steigerung der zytostatischen Wirkung auf den Tumor. Neben einer vermehrten Teilremission zeigte der Tumor der vorbehandelten Versuchsgruppe geringere Nukleinsäure-Gehalte bei höheren spezifischen Alkylierungsraten parallel zu einer gegenüber der Monotherapie verminderten DNS-Synthese.

Die Resultate der Ausscheidungs- und Organanalysen zeigten eindeutige Unterschiede zwischen der Monotherapie und der Cyclophosphamid-Therapie mit Vincristin-Vorbehandlung, die bei fehlender biologischer Signifikanz zumindest deutliche Tendenzen erkennen ließen. Wir fanden bis 120 h nach Applikation höhere Ausscheidungsraten der Cyclophosphamid-Gruppe auffällig an Zytostatikum selbst (19 % der Dosis) und an Carboxyphosphamid (31 % der Dosis), entsprechend geringere Ausscheidungsgrößen in der Gesamtausscheidung, aber auch an Cyclophosphamid (10 % der Dosis) und Carboxyphosphamid (19 % der Dosis) in der vorbehandelten Gruppe (vergl. Abbildung 3). Die renale

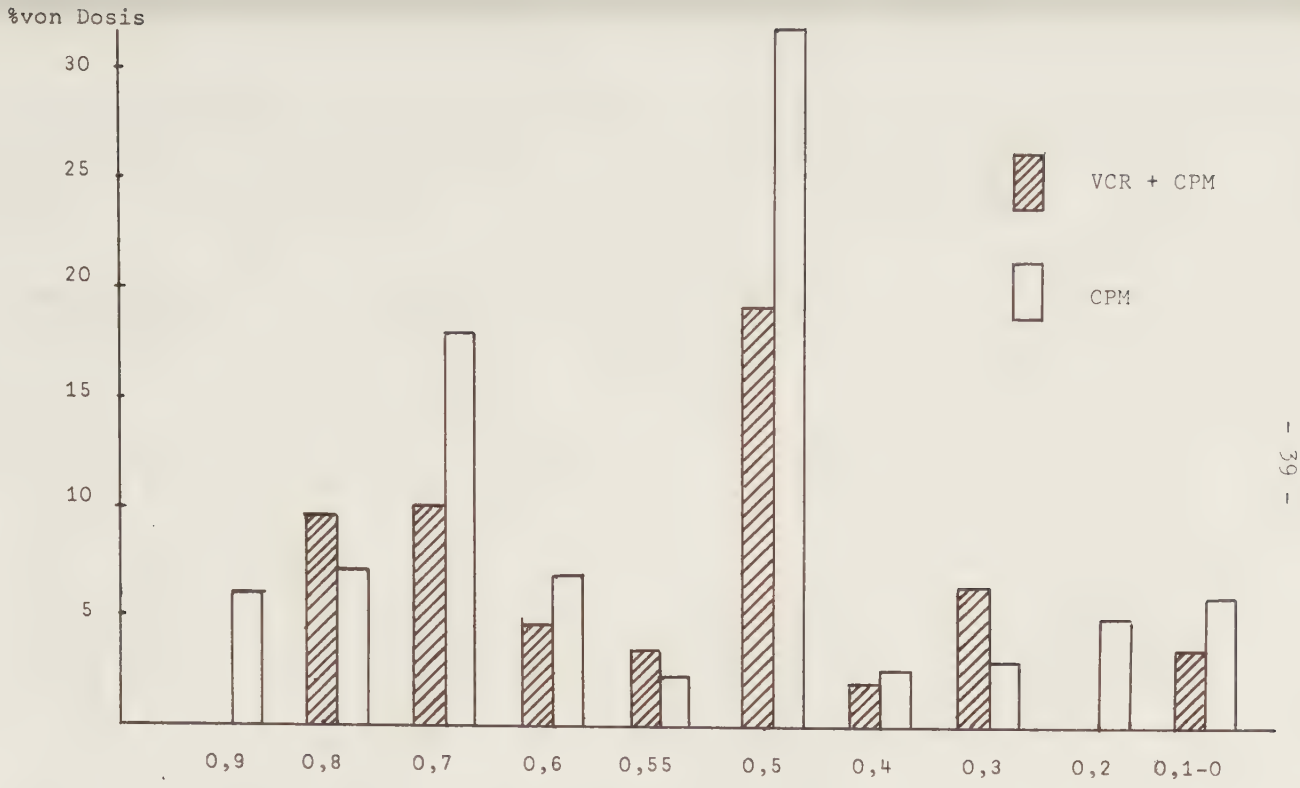


Abbildung 3 : Renale Ausscheidungen an Cyclophosphamid (CPM) und chromatographisch charakterisierten Metaboliten(% von Dosis) bis 120 h nach intravenöser Stoßtherapie von 30 mg/kg ^{3}H- Cyclophosphamid mit und ohne Vincristin (VCR) Vorbehandlung (30 µg/kg, i.p.) bei der Ratte (n=8)

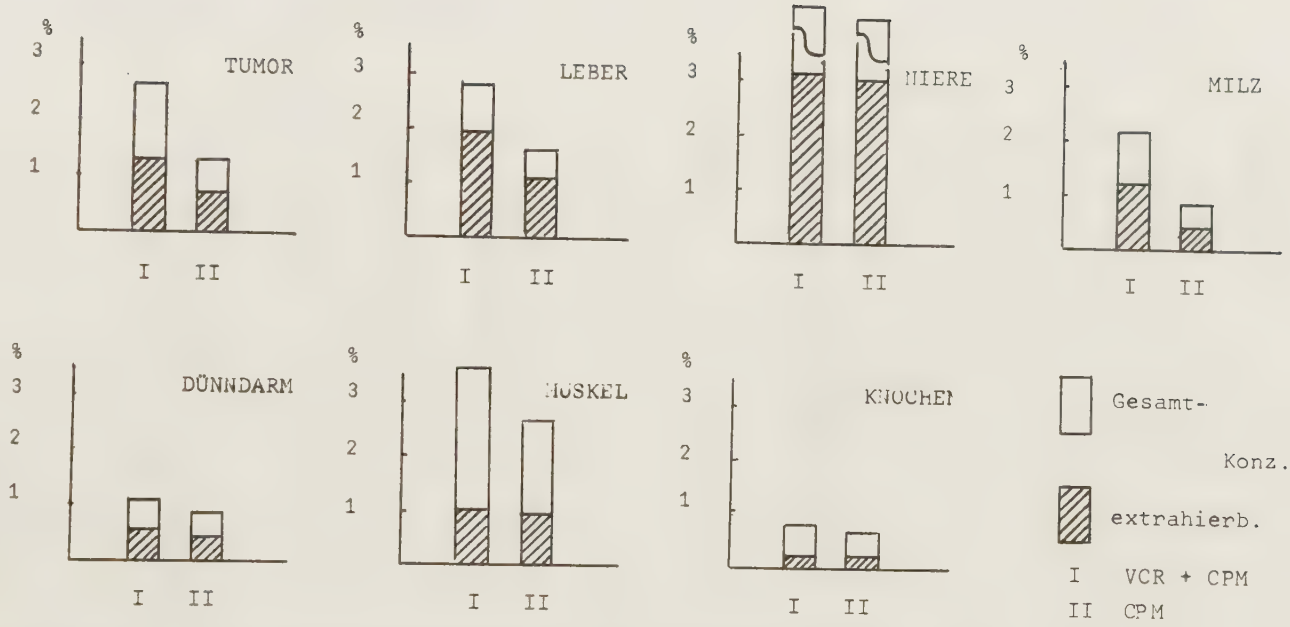


Abbildung 4 : Relative Konzentrationen (%) in Organen der Ratte (n=8) am 5.Tag nach i.v. Applikation von 30 mg Cyclophosphamid (CPM)/kg mit und ohne Vincristin (VCR) Vorbehandlung (30 µg/kg, i.p.) (100% rel. Konz. = 30 µg bzw. 0,1 µmol Cyclophosphamid äquimolar/g Organ)

Minderausscheidung in der teilsynchronisierten Gruppe spiegelte sich in deutlich höheren Restkonzentrationen in den analysierten Organen der Tiere dieser Gruppe wider (vergl. Abb. 4), d. h. daß Cyclophosphamid bzw. seine relativen Metabolite in wesentlich höherem Maße mit biologischem Substrat reagiert hatten. Die geringeren Extraktionsgrößen der Organhomogenate ergaben in der radiochromatographischen Analyse einen relativ hohen Anteil an alkylierten niedermolekularen Biomolekülen, d. h. die absoluten Größen an freien Substanzen waren ausgesprochen niedrig. Jedoch muß hier berücksichtigt werden, daß die höheren Organkonzentrationen der vorbehandelten Gruppe zu annähernd gleichen absoluten Konzentrationen an freien Substanzen in beiden Versuchsgruppen führten. Interessant ist, daß noch am 5. Tag p.i. unverändertes Cyclophosphamid in einigen Organextrakten zu finden war. Aktivierungen dieser äusserst geringen Konzentrationen lassen jedoch keine wertbaren zytotoxischen, geschweige denn zytostatischen Reaktionen erwarten. Auffällig ist, daß diese Cyclophosphamid-Konzentrationen in beiden Gruppen am 5. Tag in Leber und Lunge, bei der Cyclophosphamid-Gruppe auch in der Milz, auftraten, nicht jedoch im Tumor. Das Vorliegen dieser niedrigen Restkonzentrationen an Cyclophosphamid auch in diesen stoffwechselaktiven Organen muß im Zusammenhang mit der Abnahme der Metabolisierungswahrscheinlichkeit parallel zum Konzentrationsabfall in den Organen gesehen werden. Der Abfall der Gesamtkonzentration nach Cyclophosphamid-Stoßtherapie bei der Ratte unterliegt von 24 h an einer Halbwertszeit von mehr als 4 Tagen und stellt eine Resultante der Überlagerung von 2 oder 3 e-Funktionen dar (41).

Die Analysenergebnisse der renalen Ausscheidungen lassen vermuten, daß unter Vincristin-Vorbehandlung

die Rückresorption aus dem enterohepatischen Kreislauf vermutlich eingeschränkt war. Somit können sowohl Cyclophosphamid als auch seine Abbauprodukte vermehrt enteral ausgeschieden worden sein, wenn man die Möglichkeit ausser Acht läßt, daß die niedrigere renale Elimination des Zytostatikums selbst auf eine intensivere Aktivierung unter den Bedingungen der Teilsynchronisation zurückgeführt werden kann, wofür die höheren Restkonzentrationen in den Organen dieser Versuchsgruppe sprechen. Die Synchronisation wirkte sich entsprechend auf die Mucosazellen des Dünndarms aus. Die Rückresorption von primären und sekundären Metaboliten, aber auch von Cyclophosphamid könnte durch den gestörten Zyklus bzw.durch Verminderung der Stoffwechselaktivität beeinträchtigt worden sein. Ob sich eine gesteigerte Reaktivität von Cyclophosphamid unter der Vincristin-Vorbehandlung auf die Rückresorption im Dünndarm ausgewirkt hat, kann nicht beurteilt werden, da, wie bereits erwähnt, die Kotausscheidungen nicht analysiert wurden. Hierüber können natürlich nur genaue experimentelle Untersuchungen Aufschluß geben.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die angewandte Cyclophosphamid-Dosis keine therapeutische Dosis darstellt, da die DC 50 für den von uns eingesetzten resistenten Tumor bei 80 mg/kg KG liegt. Um für unsere Analysen noch ausreichend Tumormaterial zu erhalten, begrenzten wir die Remission durch die Applikation der niedrigen Cyclophosphamid-Dosis.

Im Timing, d. h. im zeitlichen Abstand der Applikation beider Zytostatika, gingen wir von den von KLEIN und Mitarbeitern (28, 29) erstellten Untersuchungsergebnissen aus und führten den Cyclophosphamid-Stoß 8 h nach Vincristin-Gabe durch. Die normale Zykluszeit des soliden Yoshida-Sarkoms beträgt nach KLEIN 21 h (29),

wobei die S-Phase 10 h andauert (28).

In unseren Untersuchungen wurde eine unterschwellige Dosis (0,030 mg/kg Körpergewicht) an Vincristin gegeben, d. h. es kommt, wie KLEIN zeigen konnte (1, 29, 30, 33), nicht zu einem zytostatischen, zytotoxischen Effekt. Dies führt zu einer kurzfristigen Arretierung der Zellen in der M-G_2-Phase, in der zeitlich begrenzt, die aus der S-Phase auslaufenden Zellen blockiert werden. Da dieser Block zeitlich begrenzt ist, laufen diese Zellen synchron aus der G_2-M-Phase in die G_o-Phase und treten synchron in die G_1-S-Phase ein (29, 30, 32, 33), d.h. sie haben zu dem Zeitpunkt der Cyclophosphamid-Injektion 8 h nach Vincristin-Gabe eine größere Zellpopulation in der S-Phase als unter Normalbedingungen. Auf unsere Versuchsbedingungen übertragen, könnte dies bedeuten, daß die erhöhte S-Phasen-Population im Tumor, aber auch möglicherweise in kritischen Organen, zu einer erhöhten Permeation sowohl von Cyclophosphamid als auch von reaktiven Metaboliten führte. Die gesteigerten Stoffwechselaktivitäten der Zellen in der S-Phase könnten die Aktivierung und damit letztlich Giftung des Cyclophosphamid (alsS-/G-Phasen spezifisches alkylierendes Zytostatikum) begünstigen. Dies würde die höheren, auf Reaktion mit Biomolekülen zurückzuführenden Restkonzentrationen in Tumor und Organen der teilsynchronisierten Tiere, und somit auch die erhöhte onkostatische Wirkung im Tumor gegenüber der nicht vorbehandelten Versuchsgruppe erklären.

Als mögliche Angriffspunkte der gegifteten Metabolite können in erster Linie die Membranen, die Nukleinsäure und Proteine angesehen werden, vor allem prosthetische Gruppen von Syntheseenzymen, wie z.B. die Thyminkinase und DNS-Polymerase. Andererseits darf nicht übersehen werden, daß es neben Alkylierungsreaktionen auch zu

Reaktionen des 4-Hydroxy-Cyclophosphamids mit Sulhydryl-Gruppen von Biomolekülen zu einer mehr oder weniger passageren Funktionsstörung in der Zelle kommen kann. Erfolgt eine spezifischeAlkylierung der DNS, dann bedingt der Repair, d. h. Elimination oder Ausbau geschädigter Moleküle und Resynthese, ein intaktes Enzymsystem. Eine totale Noxe wäre in diesem Fall gegeben, in dem die DNS spezifisch alkyliert ist und die Enzymsysteme durch funktionelle Schädigung nicht mehr in der Lage sind, den Repair durchzuführen. Dies führt zu einer Nekrose der Zelle. Wenn die Membran alkyliert ist, kann es zu Permeationsstörungen kommen, d. h. essentielle Precursoren werden an der Permeation gehindert, was durch Einschränkung oder Inhibierung der Syntheseprozesse zur Letalität führt. GRUNICKE (16) konnte dies in seinen Arbeiten mit dem trifunktionellen, direkt alkylierenden Zytostatikum Treminon beobachten.

Die im DNS-Extrakt der analysierten Organe ermittelte ^{3}H-Aktivität führten wir auf die Alkylierungsreaktionen von Metaboliten des Cyclophosphamid zurück. Daß es sich hierbei um freie Metabolite handelt, die bei der sauren Hydrolyse mit herausgezogen wurden, erscheint unwahrscheinlich. Die gründliche Vorextraktion des gepotterten Gewebes dürfte alle nicht fixierten Moleküle aus dem Organmaterial entfernt haben. Andererseits wären Reste an freien Substanzen mit Sicherheit durch die alkalische Hydrolyse der RNS,die Neutralisation und das Nachwaschen des Rückstandes mit der noch intakten DNS herausgenommen worden. Der erforderliche Beweis hierfür steht jedoch noch aus, da wir auf Grund der niedrigen spezifischen Aktivitäten eine Zuordnung der ^{3}H-Aktivität zu chromatographisch getrennten Nukleotiden der DNS nicht führen konnten. Untersuchungen von SCHAUMLÖFFEL und Mitarbeitern (40)

an isolierter, proteinfreier DNS, die nach einem modifizierten Marmor-Verfahren aus verschiedenen Organen der Ratte nach Cyclophosphamid-Stoßtherapie gewonnen wurde, führte zu gleichen Alkylierungen wie in unseren Versuchen, was das Vorliegen von Alkylierungsreaktionen bestätigen dürfte. Zum anderen sind gleiche spezifische Alkylierungen von Chromatin und DNS in der Leber nach Cyclophosphamid-Therapie von HARBERS (17) analysiert worden. Beachtung sollte auch die Tatsache finden, daß wir von der DNS Vorgänge der Methylierung und Demethylierung durch Methylasen kennen. Alkylierungen können auf Grund ihrer chemischen Reaktionsabläufe an den gleichen Stellen stattfinden wie die Methylierungen (34), nur finden wir im Cyclophosphamid ein bifunktionelles Alkylanz, d. h. zwei reaktive Stränge. Es können damit Einzelreaktionen aber auch Vernetzungen oder Verkettungen, sogenannte cross links auftreten (18).

Die RNS-Werte müssen mit dem notwendigen Vorbehalt gewertet werden, da hier die Möglichkeit besteht, daß z. B. Fixierungsprodukte von 4-Hydroxy-Cyclophosphamid mit SH-Gruppenträgern im biologischen Substrat durch die alkalischen Hydrolysen aufgehoben werden können.

Der DNS-Gehalt des Tumors war unter Vincristin-Vorbehandlung nur 1/2 bis 1/3 so groß wie ohne Teilsynchronisation (vergl. Abbildung 5). Wenn eine echte 5-fach höhere Alkylierung in der DNS/RNS vorliegt und damit eine Proportionalität zum DNS-Gehalt (vergl. Abbildung 5), wie es unsere Ergebnisse zeigen, so könnte aus dieser Korrelation abgeleitet werden, daß eine höhere Alkylierung der Nukleinsäuren, aber auch vom Rückstand zu dem minderen DNS-Gehalt bzw. zu einem höheren nekrotischen Anteil, d. h. einer günstigeren Teilremission im Tumor direkt in Beziehung steht. Die höhere spezifische Alkylierung der Nukleinsäuren und des Rückstands zeigte, daß unter Vincristin-Vorbehandlung ver-

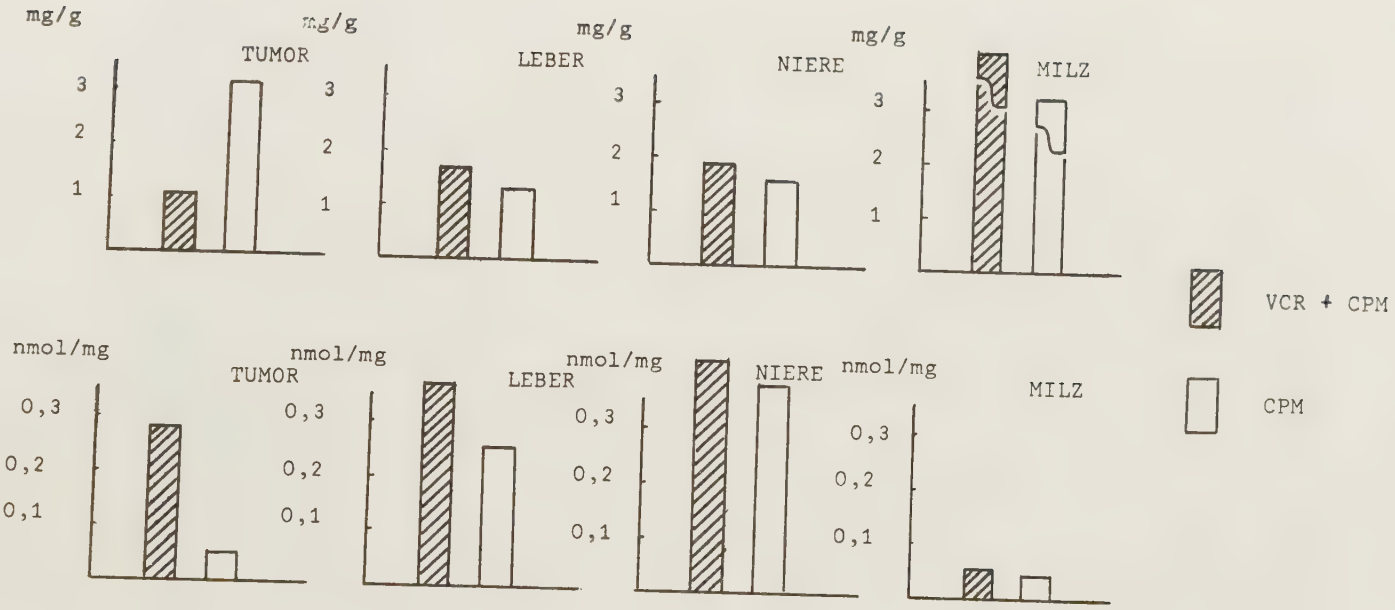


Abbildung 5 : Spezifischer DNS- Gehalt (mg/g) und spezifische Alkylierungen der DNS (nmol/mg) in Organen der Ratte (n=8) am 5.Tag nach i.v. Applikation von 30 mg (0,1mmol) Cyclophosphamid (CPM)/kg mit und ohne Vincristin (VCR) Vorbehandlung (30 µg/kg,i.p.)

mehrt Reaktionen von Cyclophosphamid-Metaboliten mit den entsprechenden Fraktionen der analysierten Nukleinsäuren und restlichen Zellbestandteile klar zu erkennen sind. Bei Betrachtung der Alkylierungsgrößen und der DNS-Syntheserate sollte im Zusammenhang mit der Tatsache, daß sich der Tumor bereits am 5. Tag wieder in einer erneuten Wachstumsphase befindet, berücksichtigt werden, daß wir hier die gesamte Population des entsprechenden Gewebes analysiert haben. Die Mittelwerte, die eine Überlagerung des gesamten Zellmaterials darstellen, müssen daher differenziert werden in außerordentlich hoch alkylierte, kaum oder garnicht alkylierte Populationen der Zellfraktionen, wobei selbstverständlich auch zwischen spezifischen und unspezifischen Reaktionen unterschieden werden muß.

Aus den niedrigen Tumorgewichten der 8 Tiere der vorbehandelten Gruppe geht hervor, daß die unterschiedlichen spezifischen Alkylierungen der Tumoren beider Gruppen mit der Proliferation in Zusammenhang gebracht werden müssen. Die Frage nach der Ursache der verminderten Proliferation zum einen, und der DNS-Synthesehemmung zum anderen, kann nicht auf die Wirkung des Vincristin zurückgeführt werden, da nicht nur eine unterschwellige Dosis appliziert wurde, sondern die DNS-Syntheseraten 5 Tage nach der Therapie ermittelt wurden, zu welchem Zeitpunkt keine Vincristin-Wirkung mehr erwartet werden kann. Die unterschwellige Dosis ist nur für die partielle Synchronisation verantwortlich (30, 32, 33), wodurch auf Grund der erhöhten Permeabilität für Cyclophosphamid und auch für zytostatisch aktive Folgeprodukte in der angereicherten S-Phasenpopulation zytostatisch/zytotoxisch wirksame Effekte vermehrt zur Wirkung kamen.

Bei Betrachtung der Organkonzentrationen ohne ihre

Differenzierung finden wir höhere Restkonzentrationen unter Vincristin in allen Organen, die teilweise signifikant waren (vergl. Abbildung 4). Ob die ermittelten Alkylierungen auf die angenommene Wirkform NH-Lost-phosphorsäure-diamid zurückgeführt werden müssen, kann nicht beurteilt werden, da auch Metabolite des Cyclophosphamid, die keine zytostatische Wirkung besitzen und als stabile Stoffwechselprodukte angesehen werden, in vivo reaktiviert werden können und so zu unspezifischen toxischen Reaktionen führen können (42). Die spezifischen Alkylierungen liegen am höchsten in Niere, Leber und Tumor. Betrachtet man den Gesamtorganismus, so müssen natürlich auch Muskel und Knochen als kritische Organe angesehen werden, da sie den größten Anteil am Körpergewicht beinhalten. Über die Spezifität der toxischen Wirkungen dieser Reaktionen in Tumor und kritischen Organen können noch keine Aussagen gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser orientierenden Studie bestätigen eine durch mehrere biologische Parameter gesicherte höhere Tumorselektivität unter partieller Synchronisation im Vergleich zur reinen Monotherapie. Die sich ebenfalls abzeichnenden, vermutlich toxischen Nebenreaktionen, wie sie aus den überhöhten Organkonzentrationen unter den Bedingungen der Teilsynchronisation hervorgehen, können in ihrer Auswirkung nicht abgeschätzt werden. Zumindest bestätigen unsere Untersuchungen eine Optimierung der zytostatischen Wirkung von Cyclophosphamid bei Vincristin-Vorbehandlung auch im Tierexperiment, wie sie von KLEIN und Mitarbeitern in der Therapie maligner Tumoren beim Menschen augenfällig dargelegt wurden (27, 30, 31, 32).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In einer tierexperimentellen Studie wurde der Einfluß einer partiellen Synchronisation auf die zytostatischen und zytotoxischen Effekte von Cyclophosphamid nach i.v. Stoßtherapie bei der tumortragenden Ratte (solides Yoshida-Sarkom ; n = 8) untersucht.

Am 5. Tag nach einer i.v. Applikation von 30 mg ^{3}H-Cyclophosphamid/kg Körpergewicht, d.h. am 10. Tag nach Tumorimplantation, wurden die Tiere zweier Versuchsgruppen, von denen die eine mit einer unterschwelligen Dosis an Vincristin (30 µg/kg i.p.) 8 Stunden vor Zytostatikagabe vorbehandelt war, getötet. Die Größen der in den 24 Stunden-Fraktionen gesammelten renalen Ausscheidungen wurden ermittelt und chromatographisch differenziert. In Tumor und kritischen Organen wurden die Cyclophosphamid-äquimolaren Restkonzentrationen und ihr Anteil an freien stabilen Abbauprodukten und die spezifischen Konzentrationen an DNS und RNS (mg/g Organ sowie die spezifischen Alkylierungen der Nukleinsäuren (nmol Cyclophosphamid äquimolar/mg Nukleinsäure) bestimmt. Die DNS-Syntheserate wurde über den Desoxy-Thymidin-Index analysiert und über die Tumorgewichte der Tiere beider Versuchsgruppen die Größe der Teilremission bzw. der Proliferationshemmung am 5. Tag ermittelt.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen.
1) Eine signifikante renale Minderausscheidung der teilsynchronisierten Versuchsgruppe vorwiegend in den ersten 24 h p.i. an Cyclophosphamid und Metaboliten läßt sich möglicherweise auf eine eingeschränkte Rückresorption im enterohepatischen Kreislauf zurückführen.

Die chromatographischen Urinanalysen lassen keine Änderung der Stoffwechselrichtung des Zytostatikums unter der Vorbehandlung erkennen, doch kann eine intensivere Metabolisierung im Vergleich zur Monotherapie nicht ausgeschlossen werden.

2) Die Restkonzentrationen an Cyclophosphamid-äquimolaren Substanzen lagen in Tumor und in den Organen der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe zum Teil signifikant höher und der Anteil an freien Metaboliten niedriger als in der Monotherapie-Gruppe.

3) Der spezifische Gehalt an Nukleinsäuren lag in den Tumoren der reinen Cyclophosphamid-Gruppe gegenüber der vorbehandelten Gruppe 3fach höher, während die spezifischen Alkylierungsraten speziell der DNS in den Tumoren der vorbehandelten Gruppe ca 4fach höhere Werte aufwiesen als in der Monotherapie-Gruppe. In den übrigen analysierten Organen fanden wir bei Vincristin-Vorbehandlung leicht erhöhte spezifische Konzentrationen an Nukleinsäuren und ebenfalls nur leicht erhöhte spezifische Alkylierungen. Zwei Drittel der als Alkylierungen bezeichneten Reaktionen von aktivierten Metaboliten des Cyclophosphamid entfielen auffälligerweise auf die Nukleinsäuren in Tumor und Organen (10^3 Nukleotide/Alkylierung).

4) Bei keinen gesicherten Unterschieden gegenüber der unbehandelten Kontrolle lagen die DNS-Syntheseraten in den Tumoren der Monotherapie-Gruppe um den Faktor 3 signifikant höher als in der vorbehandelten Gruppe. In den Organen Milz, Niere und Dünndarm zeigten sich in beiden Gruppen gleiche Tendenzen bei teilweise signifikanter Erhöhung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Bei beiden Gruppen fanden wir in Leber und Lunge eine deutliche Tendenz einer Depression der DNS-Syntheseraten.

5) Die niedrigen spezifischen Gehalte an Nukleinsäuren und deren höhere spezifische Alkylierungen sowie der signifikant niedrigere Desoxy-Thymidin-Index in den Tumoren der mit Vincristin vorbehandelten Gruppe korrelierte deutlich mit den in dieser Gruppe niedrigen Tumorgewichten im Vergleich zur Monotherapie-Gruppe, was eine gesteigerte Proliferationshemmung bzw. vermehrte Nekrotisierung von Tumorzellen unter der Kombinationstherapie hervorhebt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen eine gesteigerte Tumorselektivität von Cyclophosphamid bei partieller Teilsynchronisation, was auf eine vermehrte Permeation von Cyclophosphamid oder auch aktivierten Metaboliten hindeutet, aber auch die Möglichkeit einer gesteigerten Aktivierung des Zytostatikums in der Tumorzelle nicht ausschließt. Führt man die toxischen Nebenwirkungen des Zytostatikums auf Alkylierungen von Membranen, Proteinen und subzellulären Organellen zurück, so lassen sich aus den Ergebnissen keine Reduzierungen der toxischen Nebenwirkungen durch partielle Synchronisation ableiten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

(1) Brock, N.
"Comporative pharmacological study in vitro and in vivo with cyclophosphanide, cyclophosphamide metabolites and plain nitrogen mustard compounds"
Vortrag auf dem Symposion "Metabolism and Mechanism of Action of Cyclophosphamide"
Chester Beatty Res. Institute, London 1975

(2) Brock, N., Arbeitsgemeinschaft Zytostatika
"Forschungsbericht 1976"
BMFT - FB T 76 - 36 (1976)

(3) Brock, N., H.-J. Hohorst
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblutorganismus"
Naturwiss. 49 (1962) 610

(4) Brock, N, H.-J. Hohorst
"Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro"
Arzneimittelforschung (Drug Res) 13 (1963) 1021

(5) Brock, N., H.-J. Hohorst
"Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Endoxan"
III. Internat. Kongr. Chemother. 22. - 27.7.63. Stuttgart
Verh. Bd.II 1089 - 1091, Thieme Verlag Stuttgart 1964

(6) Cardinali, G., G. Cardinali
"M. about Enein: Studies on the antimitotic activity of leucocristine (vincristine)"
Blood 21 (1963) 102

(7) Cardinali, G., G. Cardinali, T.N. Mehrota
"Comparative studies on the stathmokinetic effect of vincristine, vinblastine and colchicine"
Proc. Amer. Ass.
Cancer Res. 4 (1963) 10

(8) Chandra, P.
"Quantitative Bestimmung von Desoxyribonucleinsäuren" In Methoden der Molekularbiologie,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1973

(9) Chandra, P.
"Quantitative Bestimmung von Ribonucleinsäuren"
In: Methoden der Molekularbiologie,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1973

(10) Conners, T.A., P.J. Cox, P.B. Farmer, A.B. Foster, M. Jarman
"Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide"
Bioch. Pharmacol. 23 (1974) 115

(11) Crathorn, A.R., J.J. Roberts
"Mechanism of the cytotoxic action of alkylating agents in mammalian cells and evidence for the removal of alkylated groups from desoxyribonuclein acid"
Nature (Lond.) 211 (1966) 150

(12) De Vita, V.T. jr., R.C. Joung, G.P. Cannellos
"Combination versus single agent chemotherapy: Review of the basis for selection of drug treatment of cancer"
Cancer 35 (1975) 98

(13) Frei III, E., J. Whang, R.B. Scoggins, E.J. van Scott, D.P. Rall, M. Ben
"The stathmokinetic effect of vincristine"
Cancer Res. 24 (1964) 1918

(14) Friedmann, C.N., E. Boger
"Colorimetic estimation of nitrogen mustards in aqueous media"
Analyt. Chem. 33 (1961) 906

(15) Gelfant,
zitiert nach Karnofsky, D.A., B.D. Clarkson
"Cellular effects of anticancer drugs"
Amer. Rev. Pharmacol. 3 (1963) 357

(16) Grunicke, H., F. Hirsch, H. Wolf, U. Bauer, G. Kiefer
Differential inhibition of thymedine incorporation and DNA synthesis by the alkylating antitumor agent 2,3,5-trie-thyleneiminobenzochinon (Trenimon)"
Symposium über aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren, Münster 1972

(17) Harbers, E.
Persönliche Mitteilungen

(18) Harbers, E., P. Warnecke, H. Hollandt, K. Kruse
"Untersuchungen zur Alkylierung von Chromatin in der Rattenleber nach Gabe von ^{3}H-Cyclophosphamid- "Feinverteilung" und Kinetik"
Z. Krebsforsch. 88 (1977) 237 - 254

(19) Henderson, E.S., R.J.Samaha
"Evidence that drugs in multiple combinations have materially advanced the treatment of human maligniancies"
Cancer Res. 29 (1969) 2272

(20) Hill, D.L.
"A review of cyclophosphamide"
Charles C. Thomas Publ., Springfield, III 1975

(21) Hill, D.L., W.R. Laster, R.F. Struck
"Enzymatic metabolism of cyclophosphamide and nicotine and production of a toxic cyclophosphamide metabolite"
Cancer Res. 32 (1972) 658

(22) Hohorst, H.-J., U. Draeger, G. Peter, G. Voelker
"The problem of oncostatic specificity of cyclophosphamide (NSC 26271): studies on reactions that control the alkylating and cytotoxic activity"
Cancer Treatm. Rep. 60 (1976) 309

(23) Hohorst, H.-J., U. Draeger, G. Peter, G. Voelcker
"The problem of specificity of cyclophosphamide: studies on reactions that control alkylating and cytotoxic activity"
Vortrag auf dem Symposion "Metabolism and Mechanism of Action of Cyclophosphamide"
Chestes Beatty Res. Institute, London, 1975

(24) Jungi, W.F., H.J. Senn
"Fortschritte in der Behandlung akuter Leukosen: Stand 1971"
Schweiz. Rundschau Med. 60 (1971) 1737

(25) Kayser, D.
"Einbau von Thymidin in Desoxyribonukleinsäuren-Rattenleber" In: Methoden der Molekularbiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973

(26) Kim J.H., B.K. Stambeck
"Synchronization of He La cells by vinblastine sulfate"
Exp. Cell Res. 44 (1966) 631

(27) Klein, H.O., K.J. Lennartz
"Chemotherapy after synchronization of Tumor cells"
Sem. Hematol. 11 (1974) 203

(28) Klein, H.O., N. Brock, P.J. Klein, K.J. Lennartz
"Relevance of Chemically induces synchronization of cell cycle to chemotherapy of human solid tumors"
Main lectures, XI Intern. Cancer Congress, Florence, 1974, Proceedings 5 (1975) 208

(29) Klein, H.O., N. Brock, K.J. Lennartz, W. Feaux de Lacoix, D. Adler, R. Gross
"Weitere tierexperimentelle Untersuchungen zur pharmakologischen Induktion einer Teilsynchronisation der Tumorzellproliferation. Ihre Bedeutung für die zytostatische Behandlung"
In: "Synchronisationsbehandlung maligner Tumoren", G. Hartwich (Hrsg.) Perimed Verlag Dr.Dr.Straube, Erlangen, 1976, S. 9 -36

(30) Klein, H.O., K.J. Lennartz
"Proliferationskinetische Grundlagen der Behandlung von akuten Leukosen"
15. Deutscher Hämatologenkongreß, Köln, 1971
In: Leukämie Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York

(31) Klein, H.O., K.J. Lennartz, R. Gross, M. Eder, R. Fischer
"In vivo und in vitro Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen"
Dtsch. med. Wschr. 97 (1972) 1273 - 1282

(32) Klein, H.O., K.J. Lennartz, W. Habicht, M. Eder, R. Gross
"Synchronisation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und ihre Bedeutung bei der Anwendung eines alkylierenden Cytostatikum"
Klin. Wschr. 48 (1970) 1001

(33) Klein, H.O., K.J. Lennartz, W. Teichmüller, R.Gross
"Cytostatic treatment of partially synchronized tumor cells in animal and men"
VIIth Int. Congr. Chemother., Prag, 1971
In: Abstract Volume II, B - 5/10 Proceedings 19

(34) Kröger, H.
"Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Antikörpersynthesen und Nukleinsäurestoffwechsel und deren Beeinflussung durch Cyclophosphamid"
Forschungsbericht BMFT - FB 76 - 38

(35) Lennartz, K.J.
"Proliferationskinetik von Tumorzellen"
In: Schmidt, C.G., O. Wetter (ed.)
"Fortschritte der Krebsforschung"
Schattauer Verlag Stuttgart - New York (1969) 333

(36) Mittermayer, Ch.
"Der mitotische Zyklus und seine Beeinflussung durch Zytostatika" In: Schmidt C.G., O.Wetter (ed.)
"Fortschritte der Krebsforschung"
Schattauer Verlag Stuttgart (1969) 359

(37) Nathanson, L., Th.C. Hall, A. Schilling, Sh. Miller
"Concurrent combination chemotherapy of human solid tumors: Experiences with a three - drug regimen and a review of the literature"
Cancer Res. 29 (1969) 419

(38) Palme, G., E. Liss, K. Oeff
"Die Proliferationskinetik von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter Einwirkung alkylierender Zytostatika"
V Intern. Congr. Chemother., Wien, 1967
Proc. - Vol. II/1 183

(39) Pfeiffer, S.E., L.J. Tolmach
"Selecting synchronous populations of mamillian cells"
Nature (Lond.) 213 (1967) 139

(40) Schaumlöffel, E.
Persönliche Mitteilungen

(41) Schaumlöffel, E., M. Clausnitzer, F. Heß, U. Röttger, R. Thome
"Vergleichende Untersuchungen zur Pharmakokinetik von ^{3}H-Cyclophosphamid und Metaboliten bei Tier und Mensch"
Therapiewoche 27 (1977) 2953 - 2987, 15

(42) Schaumlöffel, E., V. Wetzel
"Tierexperimentelle Untersuchungen über die Reaktivität stabiler Metabolite des Cyclophosphamid in vivo"
Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) im Druck

(43) Schmidt C.G.
"Fortschritte in der Chemotherapie maligner Tumoren und Leukomien"
Therapiewoche 9 (1971) 689

(44) Siebs, W.
"Mitoseablaufstörungen: III.Mitteilung zur Wirkung von Vinkaleukoblastin auf normale und maligne Zellen in vitro"
Z. Zellforsch. 61 (1963) 231

(45) Sladek, N.E.
"Evidence for an aldehyde possessing alkylating activity as the primary metabolite of cyclophosphamide"
Cancer Res 33 (1973) 651

(46) Thomson, M., M. Colvin
"Chemische Oxidation von Cyclophosphamid und 4-Methyl-Cyclophosphamid"
Cancer Res. 34 (1974) 981 - 985

(47) Valeriote, F.A., W. Bruce
"An in vivo assay for growth inhibiting activity of vinblastine"
J. nat. Cancer Inst. 35 (1965) 851

(48) Valeriote, F.A., B.E. Meeker
"A medel for the action of vinblastine in vivo"
Biophys. J. 6 (1966) 145

(49) Voelcker, G., U. Draeger, G. Peter, H.-J. Hohorst
"Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxycyclophosphamid und 4-Hydroperoxycyclophosphamid mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie"
Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 24/8 (1974) 1172

(50) Wetzel, V., E. Schaumlöffel
"Untersuchungen über einen alkylierenden ^{3}H-Cyclophosphamid-Abkömmling des menschlichen Blasenurins unter Anwendung der isoelektrischen Fokussierung"
Int. Clin. Pharmacol. 14 (1976) 279 - 283 Nr. 4

(51) Wheeler, G.P.
"Some biochemical effects of alkylating agents"
Fed. Proc. 26 (1967) 885

ANHANG

Herrn Prof. Dr. E. SCHAUMLÖFFEL bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise und Anregungen verpflichtet. Ihm gilt auch mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung für experimentelle Nuklearmedizin im medizinischen Zentrum für Radiologie der Philipps-Universität Marburg.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle den Angehörigen der Abteilung für experimentelle Nuklearmedizin im medizinischen Zentrum für Radiologie, besonders Fräulein CLAUSNITZER, Frau THOME und Herrn KREYLING für die bereitwillige Unterstützung bei den Laboruntersuchungen und der statistischen Auswertung meinen Dank aussprechen.

Die Untersuchungen wurden teilweise durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie unterstützt.

Lebenslauf

Am 22. Juni 1951 wurde ich in Berlin-Wilmersdorf geboren.
Zusammen mit meinem Zwillingsbruder wurde ich 1957 in die 7. Grundschule von Berlin eingeschult. Auf Grund des Wohnungswechsels meiner Eltern besuchte ich ab 1960 die Alfons - Volksschule in München und legte am 19. Juni 1971 am Rupprecht-Gymnasium in München die Reifeprüfung ab. Nach einem Semester Physik an der Maximilians-Universität München begann ich im Sommersemester 1972 das Studium der Zahnheilkunde an der Philipps-Universität Marburg, an der ich am 13. Sept. 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 15. März 1974 die zahnärztliche Vorprüfung ablegte. Am 20. Dezember 1976 schloß ich mein Studium durch das Staatsexamen ab und bekam am 4. Jan. 1977 die Bestallung als Zahnarzt erteilt.
Am 1. April 1977 wurde ich zum Grundwehrdienst bei der Bundeswehr einberufen.
Meine Ehefrau Elisabeth, geb. Geißler, heiratete ich am 20. Mai 1977.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten

in München: Antrum, Becker, Boehm, Faessler, Grashey, Huisgen, Jacobs, Passon, Schenk, Wolf.

in Marburg: Ahrens, Amon, Baltzer, Bernhardt, Bode, Braasch, Castenholz, Dimroth, Floréz-Cossio, Geißler, Haberich, Hilgermann, Hennis, Hensel, Hering, Heubl, Heuser, Jahnke, Karlson, Kleinsasser, Koecke, Koransky, Lauer, Lehmann, Maroske, Niemeyer, Petry, Pfütz, Richter, Rohen, Rupec, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Schnell, Schulte-Herrmann, Spröggl, Thoenes, Wesemann, Wetzel, Wiegand.